BAND 38, HEFT 3 MAI 1960

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras / Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich

M. Klinkowski Aschersleben

H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 26 Abbildungen

1960

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 38 **Heft 3** *S. 217—320 Berlin 1960*

Postverlagsort Berlin

NSC RAM MM

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL 7 JUN 1960

INHALT

Abhandlungen

KALYANASUNDARAM, R., Studies on an Antagonist of the Phytotoxin Fusaric acid. With 9 fig. 217

JUNG, J., und M. PLEMPEL, Über die Hemmwirkung des Gynäzeums bei *Primula obconica* auf Bakterien und Pilze. II. Versuche zur chemischen Isolierung der Narbenhemmstoffe 245

SCHÖNIGER, G., Anatomisch-entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an nekrosevirus-infizierter *Fragaria vesca* L. Mit 6 Abb. 250

GÄUMANN, E., J. NÜESCH und R. H. RIMPAU, Weitere Untersuchungen über die chemischen Abwehrreaktionen der Orchideen. Mit 7 Abb. 274

BORSDORF, W., Beiträge zur Fluorschadendiagnostik. I. Fluorschaden-Weiserpflanzen in der Wildflora 309

Kurze Mitteilung

MALLACH, N., Zur Morphologie der Enationen auf Blättern viruserkrankter Kirschbäume. Mit 4 Abb. 316

Besprechungen 319

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photokopiergebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/M., Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,50 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzes Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 25,40 DM **Einzelpreis 28,— DM**

From the Department of Special Botany of the Swiss Federal Institute of Technology in Zürich
Director: Prof. Dr. E. Gäumann

Studies on an Antagonist of the Phytotoxin Fusaric Acid

By

R. KALYANASUNDARAM

With 9 figures

Contents: I. Introduction. — II. Material and general methods. — III. Screening of certain essential groups of metabolites for their activity against fusaric acid on bacterial species. — IV. The separation of the "probable antagonist" of fusaric acid from yeast extract. — V. Separation of the factor by paper chromatography. — VI. Behaviour of the factor on ion exchange resins. — VII. Biological activity of the factor. — VIII. Organisms producing the antagonistic factor. — IX. Antagonism between the factor and structural analogues of fusaric acid. — X. The effect of the antagonists on the symptoms of fusaric acid injury in tomato shoots. — XI. Discussion. — Summary. — Zusammenfassung. — Literature cited.

I. INTRODUCTION

Fusaric acid is one of the wilt toxins produced by the wilt pathogens *Fusarium lycopersici* Sacc. and *Fusarium vasinfectum* Atk. and a few other members of the family *Hypocreaceae* (GÄUMANN, NAEF-ROTH and KOBEL 1952, GÄUMANN 1957). This toxin has now been demonstrated in the infected tomato and cotton plants, the respective host plants of the above mentioned pathogens (LAKSHMINARAYANAN and SUBRAMANIAN 1955, KALYANASUNDARAM and VENKATA-RAM 1956, KERN and KLUEPFEL 1956). In fact, the evidence along these lines is increasing and recently it has been reported that fusaric acid is also a toxin of the Panama disease of banana plants infected by *Fusarium cubense* F. M. Smith (PAGE 1959). Thus, toxins do play a role in plant diseases, even in tissues which themselves do not contain the parasite. The action of toxins is therefore no more in the realm of hypothesis, but it rests on experimental evidence: we thus find a similar situation to that observed in certain human diseases.

Studies on the mode of action of fusaric acid on the susceptible organs or organisms indicate that this toxin acts by interfering with different

functions at different substructures of the host (GÄUMANN, NAEF-ROTH and KOBEL 1952, GÄUMANN 1958). Hence, GÄUMANN calls its action pleiotropic (GÄUMANN 1958). The spectrum of action of fusaric acid is wide. It has been demonstrated to be toxic to algae, bacteria, yeasts, fungi and higher plants (GÄUMANN, NAEF-ROTH and KOBEL 1952, GÄUMANN 1958). In the classical sense of the term, fusaric acid is a weak antibiotic.

Studies with fusaric acid up to now show that the action of fusaric acid on susceptible organs apparently takes two different courses:

1. Injurious effect on the water permeability of the protoplasts, and
2. Injury to the ferment systems of the host (GÄUMANN 1958).

We have not as much experimental evidence on the latter effect of fusaric acid as on the former (BACHMANN 1956, 1957, GÄUMANN and LOEFFLER 1957). The results in this direction were the effect of this toxin on the tissue respiration of tomato and yeast (NAEF-ROTH and REUSSER 1954, REUSSER and NAEF-ROTH 1956). Recently it has also been shown that fusaric acid competitively inhibits the polyphenoloxydase (BOSSI 1960). On the basis of the chemical configuration of the molecule, it seems possible that fusaric acid may form chelates, thereby causing heavy metal deficiency in host tissues (DEUEL 1954).

Although the action of fusaric acid is manifold, we may reasonably expect that some of the injuries caused are basic and more fundamental in nature, and therefore common to all organs and organisms susceptible to fusaric acid. If this is so, the other host specific and tissue specific injuries play an additive role in the clinical picture, or, they superimpose on the ground effect.

Ever since the discovery by WOODS (1940) that sulfanilamide acts in bacteria by competitively replacing one of the essential metabolites of the bacterium, p-aminobenzoic acid, evidence is growing that many toxins and antibiotics affect the susceptible organisms by antimetabolite action. There are many examples of competitive antagonism to an essential metabolite in the field of antibiotics and antivitamins (WOOLLEY 1952). However, very few cases have been demonstrated in the field of phytopathologically interesting toxins. That such possibilities do exist is shown in the wild fire disease of tobacco. Its pathogen *Pseudomonas tabaci* WOLF and FOSTER produces a toxin, which has been shown to be an antimetabolite of the amino acid methionine (BRAUN 1955).

With this in view, we asked ourselves the following questions:

Is the toxicity of fusaric acid fully or in part attributable to its antagonism of some essential metabolite of the susceptible organisms or tissues? If so, is it possible to remove its toxicity to susceptible organisms and organs by administering the hypothetical metabolite?

Since it is easier to demonstrate a metabolite-antimetabolite relationship with microorganisms, the studies were initiated with this method. However, the ultimate aim was to see if a similar mode of action of fusaric acid also exists in tomato plants.

II. MATERIAL AND GENERAL METHODS

The following cultures of microorganisms have been used in the course of these investigations:

Organisms:

Fusarium lycopersici Sacc.
Ustilago zeae (Beckm.) Ung.
Ustilago sphaerogena Burr. ex Ellis et Everh.
Candida vulgaris auct.
Saccharomyces cerevisiae Hans.
Bacillus subtilis Cohn
Escherichia coli (Mig.) Cast.
Staphylococcus aureus Rosenb.

Media used for cultivation and maintenance:

Bacteria

Broth medium		Synthetic medium	
Meat extract	3.0 g.	$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g.
Peptone	5.0 g.	KH_2PO_4	2.5 g.
Water (distilled)	1000 ml.	Na_2HPO_4	3.5 g.
		$MgSO_4$	0.5 g.
		Glucose	20.0 g.
		Water (distilled)	1000 ml.

Fungi and Yeasts

Malt water		Richard's medium	
Malt extract	25 g.	NH_4NO_3	10.0 g.
Water (distilled)	1000 ml.	KH_2PO_4	5.0 g.
		$MgSO_4$	2.5 g.
		$FeCl_3$	0.02 g.
		Glucose	50.0 g.
		Water	1000 ml.

For agar media these were supplemented with 1.8 % agar-agar.

III. SCREENING OF CERTAIN ESSENTIAL GROUPS OF METABOLITES FOR THEIR ACTIVITY AGAINST FUSARIC ACID ON BACTERIAL SPECIES

Our aim is to see whether, among the different groups of vital metabolites, there exists a substance which could reverse partially or fully the toxicity of fusaric acid to certain bacterial species. It was therefore planned to study the effect of the following groups of substances: vitamins, phenols, purine and pyrimidine bases, certain substances known to be involved in detoxication mechanisms in biological systems, yeast extract and beef extract. The latter two substances are composed of known and unknown biologically essential metabolites.

1. Minimum level of fusaric acid inhibitory to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

Before proceeding with the actual investigation, it was thought worthwhile to cultivate the two bacterial species in a simple nutrient solution rather than in a broth medium which contains unknown growth factors. Since fusaric acid is a weak antbiotic, fairly high concentrations are needed to inhibit the growth of bacteria, in the range of 10^{-3} to 10^{-4} molar (GÄUMANN, NAEF-ROTH and KOBEL 1952). It was also our intention to see whether the sensitivity of the two organisms to fusaric acid could be increased in a simple nutrient solution. Experiments were set up to study the minimum dose of fusaric acid inhibitory to the bacterial species in the broth as well as in the synthetic medium.

a) Preparation of the medium and dilution series

Serial dilution was used as the assay method. The range of fusaric acid concentration was maintained from 0.25 µg/ml to 100 µg/ml medium. The dilution technique was slightly modified, and the following concentrations of fusaric acid were used: 0.25, 0.75, 2.5, 5.0, 7.5, 25.0, 40.0, 50.0, 60.0, 80.0, and 100.0 µg/ml. of the medium.

The synthetic as well as the broth medium was divided into twelve 90 ml. aliquots and a stock solution of 1 mg/ml fusaric acid was maintened in a 0.2 molar phosphate buffer at pH 6.2. From this a second set of working stock solutions was prepared in such a way that each solution had a concentration ten times that which was actually needed for the medium. For each concentration, 10 ml of this fusaric acid solution was added to 90 ml of medium to give the necessary dilution. Thus, when a dilution of 5 µg/ml of fusaric acid is needed in the medium, 0.5 ml is taken from the first stock solution containing 1000 µg/ml, and diluted to 10 ml with phosphate buffer. These 10 ml (fusaric acid concentration 50 µg/ml) were added to 90 ml of the medium to give the working concentration of 5 µg/ml. The control received 10 ml of the buffer solution. The pH of the medium after autoclaving was 6.2. From each 100 ml aliquot, 5 ml were pipetted into test tubes which subsequently were inoculated with the organism. Each dilution had four replicates. Pipetting was done under sterile conditions, as was the adding of fusaric acid. In order to maintain uniform volumes, sterilisation was not performed in the test tubes.

b) Preparation of the inoculum

Escherichia coli grown for 18 hours in broth medium was diluted 100 times with 0.9 % NaCl, and used as the inoculum. For *Bacillus subtilis* however, sterile spore suspensions were prepared with saline straight from beef-extract agar slants in which the bacteria were grown at 37 °C for 18 hours. The constancy of the inoculum was checked by the turbidity of the solution in the spectrophotometer at 420 mµ. The spore suspensions could be stored in the cold for one to two months. One drop of the spore suspension was added to each tube. The tubes with synthetic medium were incubated for 24 hours, and the others for 18 hours at 37 °C.

c) Results

The growth of the organism was measured turbidimetrically. The results presented in Table 1 show that the growth of both *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in the synthetic medium was inhibited at a fusaric acid concentration of 5 μg/ml. The minimum dose of fusaric acid just inhibiting the growth of the two species in the synthetic medium, lies between 2.5 and 5.0 μg/ml. However, in the broth medium, the minimum amount of fusaric acid for inhibiting growth lies between 50 and 60 μg/ml. Thus the sensitivity of both test organisms to fusaric acid is increased about 15 times in the synthetic medium. For further investigations the synthetic medium was used, as fusaric acid here acted at a physiologically lower level.

Table 1

The minimum dose of fusaric acid needed to inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* in synthetic and broth media

Test organism	Media	Concentration of fusaric acid in μg/ml										
		100	80	60	50	40	25	7.5	5	2.5	0.75	0.25
Escherichia coli	Synthetic	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	Broth	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus subtilis	Synthetic	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	Broth	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+

— no growth; + growth.

2. Vitamin supplement to the medium and the toxicity of fusaric acid to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*

The following vitamins were used for the investigation: thiamine, riboflavin, pyridoxin, nicotinic acid, nicotine amide, panthothenic acid, p-aminobenzoic acid, biotin, inositol and ascorbic acid. All the vitamins except ascorbic acid were supplied to the medium at three different levels: 0.1, 5 and 10 μg/ml of the medium. Ascorbic acid, however, was supplied at the level of 5, 10 and 50 μg/ml of the medium. The dilutions were made under sterile conditions in the same way as before: 1 ml vitamin solution was added to 99 ml of the medium which already contained the appropriate concentration of fusaric acid. None of the vitamins tried, except ascorbic acid, could reverse the toxicity of fusaric acid to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Even with ascorbic acid amendment to the medium, the growth of *Bacillus subtilis* was observed, up to 7.5 μg, and *Escherichia coli* up to 25 μg of fusaric acid per millilitre. The corresponding level in the control, i. e. with no ascorbic acid, was 2.5 μg fusaric acid per ml.

Experiments were then set up to try the effect of increasing concentrations of ascorbic acid in the medium on the toxicity of fusaric acid. Higher levels of ascorbic acid, viz. 200 and 500 μg/ml were themselves toxic to the growth of the bacteria and sometimes growth was belated. So

it is concluded that the partial reversal of toxicity of fusaric acid to the bacteria by ascorbic acid may not be a direct effect of antagonism, but only a change in the redox potential of the medium. It is worthwhile to note that pyridoxin and nicotinic acid, which are structural analogues of fusaric acid, show no antagonism towards fusaric acid.

3. Role of phenolic compounds in reversing the toxicity of fusaric acid to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*

Fusaric acid has been shown to inhibit the activity of polyphenoloxydase competitively (Bossi 1960). Assuming that this inhibition follows the normal pattern, it might be expected that fusaric acid competes with the normal substrates of this enzyme. Conversely, if an external source of this substrate were to be supplied, it should be possible to eliminate the inhibition of polyphenoloxydase by fusaric acid. An experiment was set up to try the effect of fusaric acid in the synthetic medium on the two species of bacteria in the presence of certain phenolic compounds. Protocatechoic acid, paraphenyl and phloroglucinol were tried at one concentration. Tyrosine, cresole and pyrocatechol were tried at three different concentrations. Preliminary experiments showed that higher concentrations were toxic.

Results: tyrosine was observed to reverse the toxicity of fusaric acid in both organisms. But this was limited. Increasing concentrations of tyrosine failed to increase the minimum dose of fusaric acid. Other compounds gave no positive response (Table 2).

Table 2

The effect of certain phenolic compounds on the possible antagonistic effect of fusaric acid. Test organisms, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*

Supplements in μg/ml	Fusaric acid concentration μg/ml						
	50	25	7.5	2.5	1.0	0.75	0.25
Tyrosine 100	—	+	+	+	+	+	+
Tyrosine 200	—	+	+	+	+	+	+
Tyrosine 300	—	+	+	+	+	+	+
Cresol 100	—	—	—	+	+	+	+
Cresol 200	—	—	—	+	+	+	+
Cresol 300	—	—	—	+	+	+	+
Pyrocatechol 100	—	—	—	+	+	+	+
Pyrocatechol 200	—	—	—	+	+	+	+
Pyrocatechol 300	—	—	—	+	+	+	+
Control	—	—	—	+	+	+	+
Protocatechoic acid 100	—	—	—	+	+	+	+
Paraphenyl 100	—	—	—	+	+	+	+
Phloroglucinol 100	—	—	—	+	+	+	+

— no growth; + growth.

4. Addition of certain purine and pyrimidine bases to the medium and the inhibition of growth of the two species of bacteria by fusaric acid

Adenine, hypoxanthine, guanine, xanthine among purine bases, cytosine, uracil, thymine, cytidine, uridine, thymidine among pyrimidine bases and adenosine, guanosine and xanthosine among purine ribosides were used in this experiment. Two different concentrations of the individual amendments were used, viz. 100 and 500 μg/ml. None of these compounds had any effect in reversing the toxicity of fusaric acid to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli.*

5. Addition of certain detoxicating agents to the medium and the effect of fusaric acid on the growth of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*

Certain metabolites in human and animal tissues when they reach toxic levels are rendered harmless through the action of certain enzymes, or through conjugation reactions. This process is termed detoxication. Glycine, cysteine and glucuronic acid are known to play a specific role in conjugation reactions. The pyridine ring, in particular, when administered to the animal body is detoxicated by methylation (WILLIAMS 1947). Choline, methionine, sarcosine and the numerous betaines have been shown to be the methyl donors. In fact, when the minimum dose of fusaric acid was administered to tomato plants, i. e. 150 mg/kg fresh weight, a portion of it was metabolised into N-methyl fusaric acid derivative (KLUEPFEL 1957). Therefore it was planned to study the effect of certain of these substances responsible for detoxication in biological systems, on the toxicity of fusaric acid to the two bacteria.

The results of these investigations can be seen in Table 3. It will be noticed that of all the substances tried, glucuronic acid removed the toxicity of fusaric acid to some extent. Thus with 1000 μg/ml glucuronic acid, the minimum dose of fusaric acid needed for inhibiting the growth of the

Table 3

The effect of certain detoxicating agents on the possible inactivation of the antibiotic potency of fusaric acid. Test organisms, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*

Supplements in 1000 μg/ml	Fusaric acid concentration μg/ml						
	80	40	25	7.5	2.5	0.75	0.25
Choline	—	—	—	—	+	+	+
Betaine	—	—	—	—	+	+	+
Methionine	—	—	—	—	+	+	+
Cysteine	—	—	—	—	—	+	+
Sarcosine	—	—	—	+	+	+	+
Glucuronic acid	—	—	+	+	+	+	+
Betaine, choline and Sarcosine	—	—	—	+	+	+	+
Glycine	—	—	—	—	+	+	+
None	—	—	—	—	+	+	+

— no growth; + growth.

two organisms was above 25 μg/ml compared with 2.5 μg/ml in the control. Further increase in glucuronic acid concentration had no effect on the toxicity of fusaric acid. A somewhat similar situation was observed with sarcosine.

It is difficult to assess the role of glucuronic acid and sarcosine in decreasing the toxicity of fusaric acid to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The possibility of a portion of the fusaric acid molecule undergoing detoxication reactions is not ruled out. These substances may also act by enhancing the nutrition which is restricted in the synthetic medium.

These experiments were repeated with the normal broth medium to rule out the second possibility. Glucuronic acid, however, still lowered the toxicity of fusaric acid, but the concentration of glucuronic acid used to reverse the toxicity was very high (Table 4) in both cases. The question remains whether such a high concentration of glucuronic acid as 10 mg/ml can be expected in normal biological systems. Sarcosine had no effect in this highly nutritive medium.

Table 4

The effect of sarcosine and glucoronic acid in reversing the toxicity of fusaric acid to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in the broth medium

Organism	Amendment at 10 mg/ml	Fusaric acid μg/ml			
		100	75	60	40
Escherichia coli	Glucuronic acid	—	+	+	+
	Sarcosine	—	—	—	+
	Control	—	—	—	+
Bacillus subtilis	Glucuronic acid	—	+	+	+
	Sarcosine	—	—	—	+
	Control	—	—	—	+

— no growth; + growth.

6. On the possibility of a factor being present in yeast extract, beef extract, casamino acid or peptone which may antagonise the toxicity of fusaric acid

WOODS (1940) observed that the potency of sulfanilamide was considerably lowered when the bacteria were grown in a medium supplemented by yeast extract. Subsequent work resulted in the discovery of p-aminobenzoic acid which is present in yeast extract and which accounted for the lowering of the potency of this drug. It has been observed in the first experiment that the potency of fusaric acid is lowered by about fifteen times in the broth medium compared to that in the synthetic medium. So it was thought profitable to investigate certain common biological substances of indefinite composition like yeast extract (Difco), beef extract, peptone and casamino acids (Difco) for a possible fusaric acid antagonist.

The substances were supplied at a concentration of 1000 and 3000 μg/ml to approximate the concentrations normally used in the media for growing bacteria. The results are presented in Table 5.

Table 5

The effect of yeast extract, beef extract, casamino acids and peptone in the synthetic medium on the toxicity of fusaric acid to the bacterial species, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*

Supplements in µg/ml	Fusaric acid in µg/ml							
	80	60	40	25	7.5	5	2.5	0.75
Yeast extract 1000	—	—	—	+	+	+	+	+
Yeast extract 3000	—	+	+	+	+	+	+	+
Casamino acids 1000	—	—	—	+	+	+	+	+
Casamino acids 3000	—	—	—	+	+	+	+	+
Peptone 1000	—	—	—	—	+	+	+	+
Peptone 3000	—	—	—	—	+	+	+	+
Beef extract 1000	—	—	—	—	+	+	+	+
Beef extract 3000	—	—	+	+	+	+	+	+
Control	—	—	—	—	—	—	+	+

— no growth; + growth.

It will be seen that yeast extract and beef extract do reduce the toxicity of fusaric acid considerably, but peptone and casamino acid do not have a similar effect. Although peptone and casamino acid increase the minimum dose of fusaric acid, once a particular level is reached they have no influence. On the other hand, with yeast and beef extract the situation is quite different. With increasing concentrations of he two substances the minimum dose of fusaric acid for growth inhibition also increases. Especially with yeast extract one notices that the reversal of the toxicity of fusaric acid is competitive within the concentrations tried.

Hence further investigation was undertaken to look for the "probable antagonist" of fusaric acid in yeast.

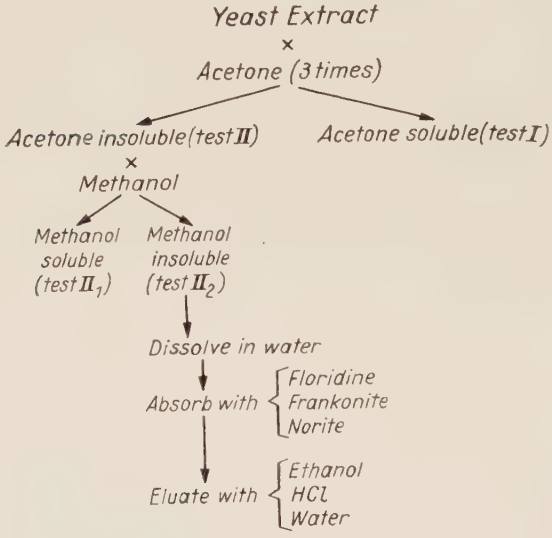
IV. THE SEPARATION OF THE "PROBABLE ANTAGONIST" OF FUSARIC ACID FROM YEAST EXTRACT

1. Modification of the technique to demonstrate competitive antagonism

a) Paper disc or agar cup method

Haenel (1956) described a simple test on agar plates to demonstrate non-competitive and competitive antagonism between a metabolite and its anti-metabolites. On agar containing the test organism, two porous cups are placed some distance apart, one containing the metabolite and the other the anti-metabolite. Material diffuses from the cups to give concentration gradients of the metabolites and the anti-metabolites. The organism grows well when it receives the metabolite (M). The non-competitive inhibitor (N) prevents growth as far as it diffuses in the agar and gives a circle of complete inhibition. The competitive inhibitor (C) also has a circle of no growth

around it, but this circle is interrupted as the metabolite concentration changes. This produces a straight demarcation line of growth between the metabolite and the anti-metabolite (Figs. 1 and 2).



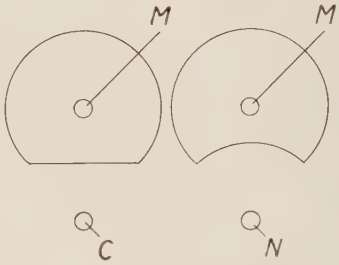


Fig. 1. Diagram of competitive and non-competitive antagonism demonstrated with paper disc method

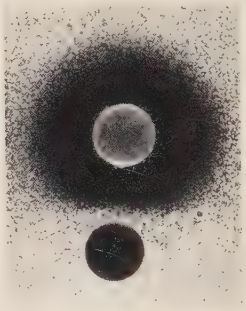


Fig. 2. Competitive antagonism between yeast extract and fusaric acid demonstrated with the paper-disc method. Test organism *Candida vulgaris*. Concentration of fusaric acid 5 × 10^{-2} molar, that of yeast extract 500 mg/ml

b) Cross strip technique

Two filter paper strips, 5 mm broad and 6 cm long, are dipped in the solution of metabolite and anti-metabolite respectively, and are dried between blotting paper. The two strips then are laid at right angles on the agar containing the test organism (Fig. 3). If the two substances diffuse identically, they produce an area of diffusion taking the shape of a cross as shown in Fig. 3. This may be possible when the two substances are structurally similar and of a similar molecular size. Where the two substances meet and overlap there are points where the concentrations of both substances are the same. These points lie on two lines running at an angle of 45°

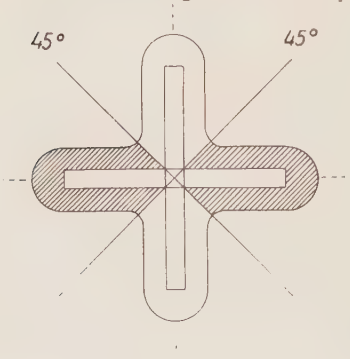


Fig. 3. Diagram of competitive antagonism with the cross strip technique. The horizontal strip contains the antimetabolite and the vertical one the metabolite

to the axes. At a particular concentration of the metabolite and the anti-metabolite, these two lines pass through the coaxial point. At this concentration the ratio of the amount of metabolite to anti-metabolite gives the inhibition index. (JUILLARD 1957).

2. Competitive antagonism of yeast extract to fusaric acid as shown by cross strip technique

Escherichia coli and *Bacillus subtilis* were grown in the synthetic agar medium in Petri dishes. In each Petri dish 17.5 ml of agar were covered with 5 ml of agar containing the test organism. The second layer was poured after the first layer had cooled and solidified. The agar received a constant amount of spore suspensions from cultures of the same age.

Preliminary experiments showed that a fusaric acid concentration of 5×10^{-3} molar absorbed on the filter paper, produced inhibition zones on both test organisms.

Difco yeast extract was tried in three different concentrations for its antagonism to fusaric acid with the cross strip technique. The concentrations tried were 100, 500 and 1000 mg/ml, while that of the fusaric acid was 5×10^{-3} molar. Similar experiments were set up with the two species of bacteria grown on broth agar. The fusaric acid concentrations used were 10^{-2} molar and 2.5×10^{-2} molar. After placing the strips of fusaric acid and yeast extract in their proper positions, the plates were incubated at 37 °C for eighteen hours in the case of broth medium and thirty-six hours for the synthetic medium. In the synthetic medium the inhibition of both test organisms by fusaric acid was reversed by yeast extract. Growth and inhibition zone formed an angle of 45 ° to the axis. This effect was most pronounced with 1000 mg/ml yeast extract, but could not be distinctly observed with test organisms grown in broth agar.

Since the concentration of yeast extract used was fairly high, it is reasonable to conclude that the antagonist to fusaric acid is probably present in small concentrations. So it was decided to tackle this problem from two sides. Firstly to look for an organism that needs smaller amounts of the fusaric acid antagonist, and secondly, to remove most of the interfering ingredients selectively from the extract.

3. Selection of a more sensitive test organism

In the relationship between a metabolite and an anti-metabolite the concentration of the one needed to nullify the effect of the other varies from organism to organism. Thus with 0.01 µg/ml of thiamine in the medium, the amount of the anti-metabolite pyrithiamine needed to reverse the growth is 0.02 µg/ml with *Cerastomella fimbriata*, 0.33 µg/ml with *Saccharomyces cerevisiae*, and more than 20,000 µg/ml with *Escherichia coli* (WOOLLEY 1952).

As the probable antagonist of fusaric acid has been found in yeast extract, it occurred to us that yeast and yeast-like organisms might be more sensitive than bacteria. With this in view we undertook our further studies

with *Candida vulgaris* and *Saccharomyces cerevisiae*, which have already been shown to be sensitive to fusaric acid (GÄUMANN et. al. 1952).

The two test organisms were grown on malt agar. The concentration of fusaric acid used on the paper strips was 5×10^{-2} molar. Compared with the bacterial species, the concentration of fusaric acid used here was high. In spite of fusaric acid being a weak antibiotic, use of this potentiality is necessary to demonstrate the presence of an antagonist. Moreover, the filter strip technique though accurate, is not very sensitive. It is not the concentration but the absolute amount of the antibiotic on the filter paper which is responsible for the inhibition. Although the dilution technique is more sensitive, the strip technique is preferred since it avoids a large number of replications. In addition, the visual demonstration of inhibition and its reversal is more convincing and easily to observe in Petri dishes.

It was found that 500 mg/ml of yeast extract could competitively reverse the toxicity of fusaric acid to *Candida vulgaris*. Here the line of 45 ° passes through the coaxial point of the strips. At this concentration, however, the same result was not to be observed with *Saccharomyces cerevisiae*. *Candida vulgaris* therefore was used as the test organism for further studies.

4. Extraction procedures to isolate the "probable antagonist" of fusaric acid

For the extraction of the anti-fusaric acid factor from yeast extract, we followed the method schematically represented below.

50 g of Difco yeast extract were extracted with 1000 ml of cold acetone overnight in a sintered glass percolator. The acetone extract was evaporated to dryness and dissolved in 50 ml of water. The residue of yeast extract was tested for its activity and found to be active against fusaric acid. Further work was undertaken with the acetone insoluble portion of the yeast.

25 g of this acetone insoluble portion were extracted with cold methanol and ethanol respectively. Neither the ethanol nor the methanol soluble portions contained the factor antagonistic to fusaric acid, but all the activity remained in the residue. This activity was undiminished when compared with that of the original yeast extract.

5. Selective adsorption technique

Since the factor antagonistic to fusaric acid could not be extracted with acetone, methanol or ethanol, experiments were carried out to see whether it could be adsorbed on the two natural adsorbents, floridine and frankonite.

20 g of Difco yeast extract were dissolved in 200 ml of distilled water and divided into two equal portions. Each portion was supplemented by 5 g of frankonite and floridine respectively. After thorough shaking, the suspensions were centrifuged and the supernatant tested. The sediments were dried at room temperature and extracted separately with 500 ml distilled water and the same amount of ethanol — 1 N HCl (80 : 20). The extracts were evaporated to dryness at 50 °C in vacuo. The residues were redissolved in 10 ml of water, the pH of which was adjusted to 5 with 0.1 N Na_2CO_3. These solutions were tested for their biological activity against fusaric acid.

The results showed that most of the factor is adsorbed by frankonite and not by floridine. From frankonite the factor can be quantitatively recovered with ethanol HCl. This method made it possible to get rid of most of the other substances in the yeast extract and to proceed with the separation of the anti-fusaric acid factor.

V. SEPARATION OF THE FACTOR BY PAPER CHROMATOGRAPHY

1. Unidimensional chromatography

The ethanol water extract containing the active factor was spotted on Whatman No. 1 filter paper. The chromatograms were run in a solvent of 70 % ethanol for 12 hours. Since the nature of the fusaric acid antagonist is unknown, it was not possible to locate the substance by spraying with a specific reagent; so the chromatograms were bioassayed by the two following techniques.

The substance was applied in six spots, and after running, the whole chromatogram was transversely cut into strips of 1.5 × 25 cm. It was possible to cut 25 such strips. Each strip was individually eluated with water by placing the narrow end of the strip between glass and immersing in a trough of water. The other tapering end was directed towards a beaker into which the liquid dropped. The whole experiment was carried out inside a moist chamber. At the end of 24 hours most of the substances were completely eluated from the paper strips. The eluates were evaporated to dryness at 50 °C. Each sample was dissolved in a small amount of water and tested against fusaric acid on test plates of *Candida vulgaris*, using the cross strip technique. Antagonism to fusaric acid was observed on strip 11, and to a greater extent on strip 12. From this it could be found that the R_f-value of the antagonist was 0.61.

In the second technique the samples were applied to the paper in the form of a thin line. After running and drying, the chromatogram was cut lengthways into strips of 38 cm × 6 mm. Every strip was then divided again into pieces 2 cm long. Pairs of these numbered strips, corresponding to the same R_f-values, were placed exactly over each other on test plates and bioassayed by the usual cross strip technique. More details of this experiment are diagramatically shown in Fig. 4. It will be seen that the antagonist to fusaric acid

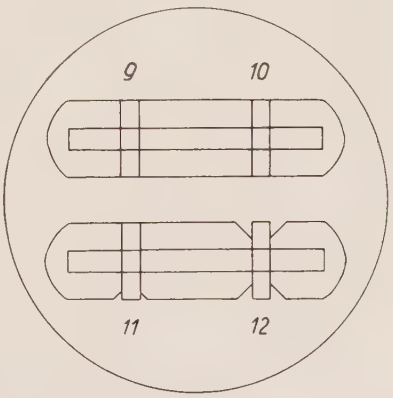


Fig. 4. Diagram of the method used to establish the R_f value of the factor antagonistic to fusaric acid. The horizontal strips contain fusaric acid while the vertical strips (2 cm long) have been cut from developed chromatograms. Greatest activity is in strip 12

is at one end of strip 11 and at both ends of strip 12. A reconstruction of these strips shows that the anti-fusaric acid factor was a spot extending from 22—25 cm, the centre of the spot lying at 22.5 cm. This gives an R_f of 0.61.

Thus it was possible to show that the "probable antagonist" of fusaric acid could be separated from yeast extract and located on paper chromatograms as a substance having a definite R_f-value.

a) Character of the antagonist on paper chromatograms

After establishing the R_f of the antagonist, it was intended to study some of its special characteristics both physical and chemical on the chromatograms. It is needless to mention that the factor, though it has been established on paper chromatograms, is not yet pure. Before embarking on further separation with another solvent, the chromatograms were observed under an ultra-violet lamp (Osram HQV 500 B, with 100 % emission at 3650—3663 Å). At the spot where the biologically active substance was found, a dark blue fluorescent spot with a bright blue-white fluorescing border was noted. The spot was oval with the lower end broader than the upper and the border fluorescence more conspicuous at the top. When the substance was streaked as a thin line the blue-white fluorescing tops joined to form a wavy line.

2. R_f-value of the factor in different solvent systems

The samples were chromatographed with different solvent systems in order to establish that the biologically active substance was identical with the one showing the characteristic fluorescence in ultra-violet light. If this proved to be so, the active spot could be located by merely inspecting the chromatograms under ultra-violet light.

For chromatography with different solvent systems, samples were first collected on a large scale. The frankonite eluate from yeast extract was chromatographed with 70 % ethanol on Whatman Nr. 3 MM. The samples were streaked at the starting line. The active zone, 2 cm broad, (R_f 0.62) which showed ultra-violet fluorescence, was eluated from ten chromatograms by soaking small strips in warm 80 % ethanol. Subsequent experience showed that the addition of a small amount of 0.2 N HCl gave better and quicker extraction. The dried extract weighed about 20 mg. This was dissolved in 5 ml of water and used for further chromatography.

0.1, 0.2 and 0.5 ml of the solution were spotted on Whatman No. 1 paper. The different solvent systems used, and the R_f-value of the biologically active spots are given in Table 6.

The R_f-value of the active spot was established by the characteristic fluorescence. The spots were cut out and eluated as mentioned above. After

Table 6
R_f-value of the anti-fusaric acid factor in different solvent systems

Solvent System	R_f
ethanol : water (70 : 30)	0.62
isopropanol : water (70 : 30)	0.58
n-butanol saturated with 3 % ammonia	0.18
sec. butanol : formic acid : water (75 : 15 : 10)	0.41
n-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5)	0.44

adjusting the pH to 4.5, the eluates were separately tested for their activity on plates of *Candida vulgaris*. All spots eluated were biologically active, thus showing that the factor could be located on paper chromatograms by its characteristic fluorescence in ultra-violet light.

3. Attempt to detect the active spot with chemical reagents

The chromatograms were sprayed with different specific reagents. Positive reactions were shown only by substances which were not identical with the active factor. These substances showed R_f-values of 0.15, 0.31 and 0.62 in n-butanol, acetic acid, water (4 : 1 : 5) where the active substance had an R_f-value of 0.44, Table 6.

a) Tests for amino groups

An 0.25 % solution of ninhydrin in 96 % ethanol was sprayed. The chromatograms were then heated to 80 °C for fifteen minutes. The substances with R_f-values of 0.15 and 0.62 gave a positive reading in contrast to the antagonist of fusaric acid and the substance with an R_f-value of 0.31.

b) Tests for phenolic groups and aromatic amines

Diazonium salts react readily with phenols and aromatic amines to form bright coloured azo compounds. Diazotized sulfanilic acid or benzenediazonium chloride are used as reagents. Colours are generally produced by these reagents with phenols and tertiary amines having a free position in ortho or para to the hydroxyl or amino group. After development in the second solvent system no reaction of the biologically active spot was observed, although there was sometimes a slight positive reaction after development in the first solvent system.

c) Tests for pyridine and allied substances

Two reagents have been widely used for pyridine derivatives such as picolinic acid, fusaric acid, nicotinic acid etc.

Dried chromatograms are exposed for an hour to cyanogen bromide vapour. Then they are sprayed with the following solution of p-aminobenzoic acid: this is prepared by dissolving 2 g of substance in 75 ml of

0.75 N HCl and adding 25 ml ethanol. Colours produced by this reagent vary between red, orange and yellow.

The DRAGENDORFF reagent was prepared according to the method of LINSKENS (1955). Fusaric acid and certain other carboxylic acids give a rosy-orange spot with this reagent.

The antagonist of fusaric acid did not react with either reagent.

d) Tests for acidic or basic groups

The reagent was prepared by dissolving 40 mg of bromocresol green in 100 ml of distilled water and adjusting the colour to a dark blue with NaOH. Then it was sprayed on the chromatograms. A yellow spot on a green-blue background was distinguishable which coincided with the factor. This reaction suggests that the factor is acidic in character.

VI. BEHAVIOUR OF THE FACTOR ON ION EXCHANGE RESINS

The behaviour of the factor on anion and cation resins might give additional information on its chemical nature, and it might also be helpful in large scale extraction. In this investigation Dowex 2, a strongly basic anion resin (X 8, 100—200 mesh, OH^--form), and Dowex 50, a strongly acidic cation resin (X 8, 100—200 mesh, H^+-form) were used. The resins were used in columns 2 cm broad and 6 cm high.

The Dowex 2 column was prepared by washing the resin with 60 ml 1 N NaOH followed by water until the eluate was neutral. After applying 2 ml of the biologically active solution from unidimensional chromatograms, the column was first eluated with 60 ml of water and then with 80 ml of 1 N acetic acid. Both eluates were evaporated in vacuo to dryness and tested for activity. It was found that only the second eluate was active; thus further indicating that the factor is acidic in character.

A similar amount of active sample was applied to the Dowex 50 column, which was prepared by washing with 1 N HCl and water until the eluate was neutral. The column containing the factor was treated with 60 ml of water and the same amount of 0.5 N HCl. The eluates were again evaporated to dryness, redissolved and tested for activity, having adjusted the pH to 4.5. Only the water eluate showed activity. This also shows that the factor is acidic.

VII. BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE FACTOR

1. The nature of the antagonism between fusaric acid and the factor

a) Inhibition index

In a competitive antagonism the potency of the inhibitory analogue may be expressed as a number called the inhibition index. This is the quotient of the concentration ratio of the two substances where their effects are just counterbalanced (WOOLLEY 1952). In the present in-

vestigations it was possible to obtain a picture similar to that theoretically expected (Fig. 3) by varying the concentration of one of the analogues. In order to determine this figure, the following procedure was adopted. Twenty-four spots of the active substance were eluated from two dimensionally run chromatograms. The eluate, evaporated to dryness, weighed 2.48 mg. This was dissolved in 2 ml of water and diluted to $^1/_2$, $^1/_4$ and $^1/_8$. The four concentrations were tested against 5×10^{-2} molar fusaric acid by the cross strip technique. The test organism was again *Candida vulgaris*. Fig. 5 shows that the action of fusaric acid and antagonist were just counterbalanced at the original concentration of the factor. The results suggest that the inhibition index of fusaric acid is in the order of about 10. However, it is possible that this figure is too small since the extract contained an unknown amount of impurities.

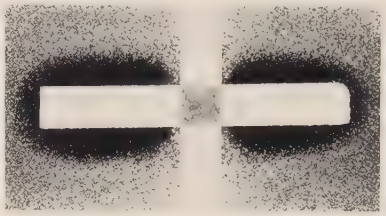


Fig. 5. Competitive antagonism between fusaric acid and the factor from yeast extract after separation on paper chromatograms. The action of the metabolite in this figure just counterbalances that of the antibiotic. From the concentration of the two the inhibition index is calculated. Test organism *Candida vulgaris*

b) Competitive nature of the antagonism

When the inhibition index is constant over a wide range of concentrations the antagonism is said to be competitive (Woolley 1952). In the cross strip technique by varying the concentration of one of the analogues (factor), the border line between inihibition and growth zone undergoes a parallel shift. Only at one concentration, however, does the line of 45° pass through the coaxial point (Fig. 5). Thus we have positive evidence that fusaric acid inhibits the growth of *Candida vulgaris* by competitively inhibiting the action of a metabolite (factor from yeast extract).

2. The spectrum of action of the factor

The antagonism between the factor and fusaric acid could not only be demonstrated with the fungus *Candida vulgaris*, but also with certain bacteria. This proved to be difficult since the bacteria had to be grown in a medium containing as small an amount of factor as possible though still permitting growth of the bacteria.

With *Bacillus subtilis* it was possible to show a competitive antagonism between fusaric acid and the factor, using a synthetic agar medium (Fig. 6). A similar situation was observed with *Staphylococcus aureus* grown in the synthetic medium supplemented by 0.25 % yeast extract. This addition was necessary for good growth since this organism is heterotrophic to a number of essential metabolites. The concentrations of fusaric acid used were 5×10^{-3} molar for *Bacillus subtilis* and 10^{-2} molar for *Staphylococcus aureus*.

With the fungus *Ustilago sphaerogena* a competitive antagonism between the factor und fusaric acid could be demonstrated only in a medium of 25 % soil extract and 0.3 % yeast extract. In a synthetic medium, however, growth was very poor. The concentration of fusaric acid used was 10^{-2} molar and 2×10^{-2} molar.

With *Escherichia coli* the factor eluated from frankonite showed non-competitive antagonism, as did the spot eluated from the chromatogram. The concentration of fusaric aicd used was 5×10^{-3} molar.

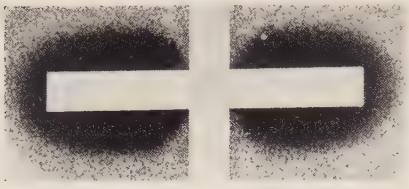


Fig. 6. Competitive antagonism between fusaric acid and the factor from yeast extract. Test organism *Bacillus subtilis*. Concentration of fusaric acid 5×10^{-3} molar

A similar result was observed with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) grown on malt agar. The concentration of fusaric acid was 5×10^{-2} molar.

3. Influence of pH on the biological activity of the factor

A solution of the factor was divided into six equal portions. The pH of the solutions, which originally was 4.5, was adjusted to 3, 4, 5, 6, 7 and 8 with HCl and Na_2CO_3, respectively. With *Candida vulgaris* the antagonism could be observed over the whole pH range; while at the pH of 3 and 4 a slight toxicity was observed at the coaxial point of the strips, an optimum antagonistic effect appeared at pH 5. With bacteria however, no antagonistic activity was found at pH 4 or 5; it started at pH 6 and was optimum at pH 8.

Control experiments were done to ensure that at the higher pH the antagonism to fusaric acid is only due to the factor, and not to the dissociation of fusaric acid, which depends on the pH. Buffer solutions, with a pH varying from 3 to 11, were made from 1 molar Na_2CO_3 and 1 molar KCl and H_3BO_3. Even at pH 10 and 11 the buffers had practically no effect on the growth inhibition caused by fusaric acid. The effect of these buffers on the toxicity of fusaric acid to all the test organisms used was studied with the cross strip technique.

VIII. ORGANISMS PRODUCING THE ANTAGONISTIC FACTOR

On the basis of the theory of competitive antagonism, fusaric acid acts by inhibiting the action of a metabolite. Its toxicity to the organism could be removed by externally supplying the metabolite i. e. the factor from yeast extract. Therefore, the antagonistic factor is produced by all the organisms mentioned above, though probably in differing quantities.

The anti-fusaric acid factor was not only detected in yeast extract but also in Tryptone (Difco), N—Z amine and wheat corn residue. The latter source suggests that the factor is produced by higher plants as well as by microorganisms.

1. Production of the antagonist to fusaric acid by *Fusarium lycopersici*

During investigations with the culture filtrate of *Colletotrichum fuscum* it was accidently observed that this fungus produced a substance with similar chromatographic properties as the anti-fusaric acid factor. Closer studies showed that *Colletotrichum fuscum* actually produces the substance in question[1]).

Since *Fusarium lycopersici* produces fusaric acid it may also produce closely related substances, such as the anti-fusaric acid factor. In these investigations *Fusarium lycopersici* was grown for three weeks. One litre of culture filtrate was shaken with increasing concentrations of acetone. After the addition of 4 litres of acetone, precipitation was completed. The precipitate was lyophilised and weighed 1.48 g. 50 mg of this amount were dissolved in water and tested against fusaric acid with the cross strip technique. Here the action of fusaric acid was competitively antagonised. However, after hydrolysing the material in 4 N HCl for four hours at 80 °C and neutralising in an atmosphere of NaOH, the activity of the factor increased about five times.

2. Paper chromatography of the factors produced by *Fusarium lycopersici* and *Colletotrichum fuscum*

The hydrolysed extracts of *Fusarium lycopersici* and *Colletotrichum fuscum* were chromatographed with different solvent systems on Whatman No. 1 paper. The biologically active antagonistic factor showed characteristic fluorescence at the same R_f-values in two different solvent systems (Table 7). On this basis it is concluded that the factors produced by *Fusarium lycopersici*, *Colletotrichum fuscum* and contained in yeast extract are identical.

Table 7

R_f-values of fusaric acid antagonist obtained from different biological sources

Source	Solvent systems	
	n-butanol : acetic acid : water 4 : 1 : 5	isopropanol : water 70 : 30
Difco yeast extract	0,44	0,59
Fusarium lycopersici	0,42	0,60
Colletotrichum fuscum	0,44	0,61

1) The author wishes to express his gratitude to Dr. R. N. Goodman for kindly supplying material and suggesting methods for this investigation.

IX. ANTAGONISM BETWEEN THE FACTOR AND STRUCTURAL ANALOGUES OF FUSARIC ACID

1. Toxicity of certain pyridine derivates to *Candida vulgaris*

Extensive studies have been made on the effect of fusaric acid and pyridine derivatives on the water permeability of plant protoplasts (BACHMANN 1956, 1957). These studies showed that the specific injury caused by fusaric acid at concentrations above 5×10^{-4} molar is, to a large extent, due to the length of the aliphatic side chain of the pyridine ring.

It was therefore of interest to investigate the activity of the factor against structural analogues of fusaric acid with differing lengths of the aliphatic side chain.

In these experiments the following substances with a decreasing length of aliphatic side chain were used: fusaric acid (5-n butylpyridine-2-carboxylic acid), dehydrofusaric acid (5-n butylenepyridine-2-carboxylic acid), 5-ethyl-picolinic acid (5-ethylpyridine-2-carboxylic acid), 5-methyl-picolinic acid (5-methylpyridine-2-carboxylic acid) and picolinic acid (pyridine-2-carboxylic acid). In addition, one pyridine derivative was used which did not contain a carboxyl group, namely, 3-n butyl-pyridine.

Table 8

Diameter of the inhibition zone caused by the different pyridine derivatives on test plates of *Candida vulgaris*. Concentration used 5×10^{-2} molar

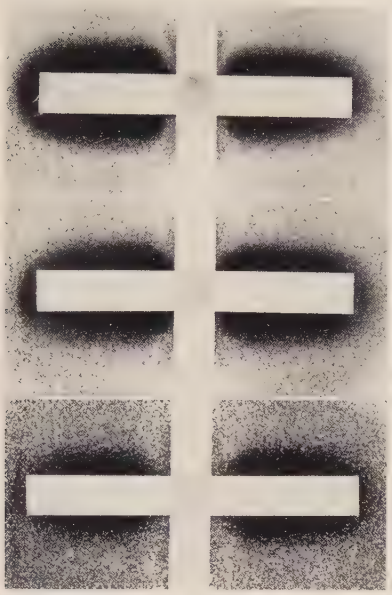
Fusaric acid	21.5 mm
Dehydro fusaric acid	20.5 mm
Ethyl picolinic acid	10.0 mm
Methyl picolinic acid	7.5 mm
Picolinic acid	0.0 mm
3 n-butyl pyridine	0.0 mm

Experiments were conducted to study the antibiotic potency of all these substances using the paper disc method on plates of *Candida vulgaris*. The results are presented in Table 8. α-picolinic acid and 3-n butyl-pyridine showed no toxicity but with all the other compounds tested, greater toxicity was observed with an increasing length of the aliphatic side chain.

2. The effect of the antagonist on structural analogues of fusaric acid

Fusaric acid, dehydrofusaric acid, ethyl picolinic acid and methyl picolinic acid were tested against the same concentration of the factor antagonistic to fusaric acid. All the pyridine derivatives were used at a concentration of 5×10^{-2} molar.

All the pyridine compounds were competitively inhibited by the anti-fusaric acid factor (Figs. 7, 8 and 9). However, with the decreasing toxicity of ethyl- and methyl-picolinic acid, the activity of the antagonist is increased. Using the same amount of antagonist the parallel shift in the 45° line between growth and inhibition zones obtained with these compounds is the same as may be observed with low concentrations of fusaric acid. Though fusaric acid and dehydrofusaric acid are equally toxic, the antagonist was more active with the former than with the latter (Figs. 7 and 8).



Figs. 7, 8 and 9. Competitive antagonism between the factor isolated from yeast extract and fusaric acid (fig. 7), dehydrofusaric acid (fig. 8) and ethyl-picolinic acid (fig. 9). Test organism *Candida vulgaris*. The concentration of the antagonist is the same against all the toxins

X. THE EFFECT OF THE ANTAGONIST ON THE SYMPTOMS OF FUSARIC ACID INJURY IN TOMATO SHOOTS

It has been shown that the removal of toxicity of the antimetabolite by the metabolite varies both qualitatively and quantitatively with different test organisms. The antagonistic effect between a specific metabolite and antimetabolite could be shown with bacterial species but not in animals or human beings or *vice versa* (WOOLLEY 1952). A demonstration of an antagonistic effect also proved to be difficult in our experiments with tomato plants. Moreover, it was difficult to obtain sufficient quantities of the factor with very few interfering substances, to test with a large number of tomato plants.

Preliminary experiments with the extract from yeast extract, which was previously found active on test plates of *Candida vulgaris*, showed no toxic injury to tomato plants even though it contained certain impurities.

Three series of twenty cut shoots of tomato plants (four-leaf stage) were allowed to take up fusaric acid, anti-fusaric acid factor and fusaric acid plus anti-fusaric acid factor, respectively. 225 mg of toxin per kg fresh weight was applied in a concentration of 2.5×10^{-3} molar. The concentration of the antagonist was so chosen that it just counterbalanced the effect of a

standard concentration of fusaric acid in tests with *Candida vulgaris*. The solutions applied to the tomato plants had a pH of 4.3.

Two separate experiments were conducted with samples of antagonist from two different extractions. The results are presented in Table 9. The Wilt index was calculated as detailed in earlier works (GÄUMANN, NAEF-ROTH and KOBEL 1952). In both experiments antagonism to the effect of fusaric acid is seen only in the leaves. In the first experiment the toxicity of fusaric acid to the leaves is reduced by about 70 % and in the second by about 75 %. The injury to the stem, however, remains undiminished.

Table 9

Symptom production by fusaric acid on tomato in the presence of the antagonist
Concentration of the toxin in all experiments was 2.5×10^{-3} molar

Exp.	pH of test solution	dose fusaric acid in mg/kg	Wilt index[1])			
			fusaric acid		fusaric acid + antagonist	
			stem	leaves	stem	leaves
1	4.3	225	2.20	1.87	2.20	0.55
2	4.3	225	1.85	1.90	1.80	0.55
3	4.3	150	1.10	2.30	0.60	0.60
4	4.3	150	1.10	2.20	0.70	0.90
5	6.5	150	0.10	1.10	0.00	0.70

[1]) The Wilt Index is a measure of the damage to tomato plants where 0 indicates no damage and 4 complete collapse of the plant.

The dose of fusaric acid applied in the above experiments is considerably higher than the dosis minima (150 mg/kg). It seemed reasonable to assume that if fusaric acid were to be antagonised in the stem this was more likely to occur at a lower dose, with no excess of toxin. Therefore in the following experiments (No. 3 and 4, Table 9), cut shoots of tomato were dosed with 150 mg/kg fusaric acid at a concentration of 2.5×10^{-3} molar. The concentration of the antagonist obtained from two different extractions was again so chosen that it just counterbalanced the effect of the standard concentration of fusaric acid in tests with *Candida vulgaris*. The pH of the test solutions was 4.3. The results are presented in Table 9.

In both these experiments with the lower dosage the stem injury caused by fusaric acid is reduced by 40—45 % respectively, and the leaf injury again by about 70 %.

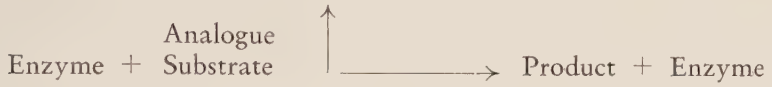
In one experiment solutions of the toxin and the antagonist were applied to tomato shoots at a pH of 6.5. The toxin dose was 150 mg/kg fresh weight and the concentration of the antagonist was chosen in the same way as in the previous experiments.

At this pH, fusaric acid only slightly affected the stem; the injury was seen on the leaves. With the toxin and antagonist the stem was not damaged at all and the leaf injury was reduced by about 35 %.

XI. DISCUSSION

The antimetabolite nature of fusaric acid

In the case of competitive antagonism between two substances in a biological system, it is generally assumed that one of them is the substrate for an enzyme reaction and the other its structural analogue (Woods and Tucker 1958). The latter combines with the same active centres of the enzyme as the substrate, but the combination does not result in enzyme activation and so the analogue is not metabolised.



Thus, in a competitive antagonism the substrate can overcome the inhibition caused by the analogue, and the concentration required will rise in direct proportion to the concentration of the analogue.

However, certain other substances in addition to the substrate can prevent or overcome the inhibitory action of the analogue. If the product of the above enzyme reaction, or substances biosynthetically derived from it, were to be available preformed in the medium, they could also affect the inhibitory action of the analogue. The amount of these products needed is fixed by the requirements of the organism. Thus, the effect of an inhibitor in any biological system is overcome competitively normally by its analogous metabolite.

Our experiments have proved conclusively that the toxicity of fusaric acid to certain microorganisms could be competitively eliminated by the analogous metabolite (factor from yeast extract). Conversely, fusaric acid possesses the character of an antimetabolite.

The part of the fusaric acid molecule responsible for its toxicity

Fusaric acid has an n-butyl group at position 5 of the pyridine ring (Gäumann, Naef-Roth and Kobel 1952). When this is substituted by an ethyl or methyl group, the toxicity is progressively reduced. Dehydrofusaric acid, which has a butylene group instead of the n-butyl group of fusaric acid, shows almost the same toxicity as fusaric acid.

Given the basic structure of α-picolinic acid, the length of the alkyl side chain of the analogues determines the magnitude of their toxicity. A similar observation was made by Bachmann (1956, 1957) in her studies on the injury caused by various pyridine derivatives to plant protoplasts.

A somewhat similar situation occurs with the vitamin thiamine and its structural analogues. The vitamin has a methyl group at position 2 of the pyrimidine ring. The corresponding ethyl analogue has only 10% of the original vitamin activity. The butyl analogue, however, is an antimetabolite (Woolley 1952).

The possible nature of the factor antagonistic to fusaric acid

In contrast to the situation with thiamine, even complete removal of the aliphatic side chain of fusaric acid (leading to α-picolinic acid) did not give rise to the analogous metabolite.

It appears that the metabolite in question (factor from yeast extract) may be a derevative of fusaric acid with a change in the pyridine ring. We have the following evidence for this view:

a) The factor from yeast extract gave no reaction for pyridine derivatives on paper chromatograms.

b) Nicotinic acid does not antagonise the toxicity of fusaric acid; thus a simple shift of the carboxyl group, which in fusaric acid is essential for its toxicity, does not lead to the metabolite in question.

c) The most potent antimetabolites, some of which are antibiotics, are structurally only slightly different from their analogous metabolites (WOOLLEY 1952). Since fusaric acid is a weak antibiotic, it is to be expected that the corresponding metabolite may differ considerably in its structure from the toxin.

d) The factor is capable of antagonising all toxic pyridine derivatives investigated so far.

It has been recently shown that certain piperidine derivatives play an important role in biological systems (GROBBELAAR, POLLARD and STEWARD 1955). Certain piperidine-carboxylic acids have nicotinic acid activity in certain organisms. The piperidine ring is derived from the pyridine ring by complete hydrogenation.

Therapy of fusaric injury to tomato plants

The toxic injury of fusaric acid to cut shoots of tomato plants could be partly removed by the factor isolated from yeast extract. With 225 mg of toxin per kg fresh weight of tomato shoots and a particular amount of the antagonist there is a 70 % reduction in the injury to the leaf. With 150 mg of the toxin per kg fresh weight and a correspondingly smaller amount of the antagonist there is nearly the same reduction in the leaf injury. Thus, the antagonism appears to be competitive in the leaves. However, the situation appears to be different with the stems of these plants. Only with the lower dose of toxin there is some reduction to the injury of the stem.

Previous work has shown that in contrast to the stem, the leaves do not react so strongly to changes in the pH of the toxin solution (GÄUMANN 1958). We therefore draw the following conclusions:

a) Within limits of experimental error it has been shown that the antagonism between fusaric acid and the factor is competitive in tomato plants.

b) This is most conspicuous in the leaves, where damage caused by fusaric acid is little affected by pH changes. Moreover the leaves, being the active centre of metabolism, offer more reactive groups than the stems.

c) Therefore a part of the injury to tomato shoots caused by fusaric acid is attributable to its antimetabolite character. The situation is analogous in some human and animal diseases.

d) The visible injury to the stem is not due to the antimetabolite nature of fusaric acid alone.

e) This discrepancy between stem and leaf injury is also due to the problem of non-uniform translocation of the toxin and the antitoxin in the plant.

Role of the metabolite in defence reactions

It has been shown that fusaric acid and its antagonist are produced by the same pathogen, *Fusarium lycopersici*. If the biosynthesis were largely to follow the same pathway for both substances, excess production of one or the other will occur with only a slight shift in the growth conditions at some stage of the biosynthesis. This kind of change may play an important role in the pathogenic wilting.

Fusaric acid has now been established to be one of the toxins responsible for pathogenesis in the wilt diseases of cotton and tomato plants (KALYANASUNDARAM and VENKATA-RAM 1956, KERN and KLUEPFEL 1956). Infection, generalisation and toxin production are essential prerequisites for a successful pathogenesis (GÄUMANN 1951). In some of the resistant varieties of host plants the pathogens do generalize but do not cause any toxic symptoms (GÄUMANN 1951, KALYANASUNDARAM and BRAUN 1958). This was explained until now to be due to a lack of toxin synthesis. However, on the basis of our experimental evidence of the production of fusaric acid and its antagonist by the same pathogen, this may partly be attributable to an overproduction of the metabolite by the pathogen. The substrate offered for the growth of the pathogen may play a decisive role in the end stage of pathogenesis; thus after infection and generalization, an unbalanced production of toxin and antitoxin by the pathogen may determine ultimately the susceptibility of the host.

The amount of fusaric acid antagonist present in the tissues of host plants must be also taken into consideration with defence reactions. The minimum dose of fusaric acid needed to cause injury to any organism or organs depends on the proportional distribution of the antagonist. This could partly explain the differing sensitivity of various host plants to fusaric acid. Thus maize and pea are ten times less sensitive than tomato, which again is equally less sensitive than cotton (GÄUMANN 1957).

As yet we have not directly demonstrated the antagonist of fusaric acid in any of these host plants, but our assumption that they may produce it is based on the following facts:

a) The antagonist of fusaric acid is a necessary metabolite for a wide variety of organisms viz. bacteria, yeasts and fungi.

b) A part of the toxicity of fusaric acid to tomato shoots is due to its replacing the function of an essential metabolite (antagonist).

Summary

Fusaric acid (5n-butyl picolinic acid), one of the wilt toxins produced by *Fusarium lycopersici,* is also an antibiotic. The sensitivity of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to this antibiotic is increased about fifteen times in a synthetic medium than in a medium containing beef or yeast extract.

This lowered potency of fusaric acid is due to an antagonist present in these two extracts.

A number of known metabolites like phenols, vitamins, purine and pyrimidine bases etc. were not antagonistic to fusaric acid.

The antagonist of fusaric acid present in yeast extract could be separated by adsorption on frankonite and subsequent elutions. In two dimensional chromatograms the substance could be located as a single spot. The R_f values of the factor in different solvent systems are also given.

Results obtained by paper chromatography and adsorption on ion exchange resins point to the fact that the antagonistic factor has acidic character.

The antagonism between the factor from yeast extract and fusaric acid is competitive with *Candida vulgaris, Ustilago sphaerogena, Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus;* it is non-competitive with *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli.*

The antagonist was also found in certain other substances commonly used in biological media. In addition it is produced by *Fusarium lycopersici* and *Colletotrichum fuscum.*

The antagonist is active not only against fusaric acid but also against certain other toxic pyridine-derivatives which are structurally related to fusaric acid.

The antagonist is capable of removing the toxicity of fusaric acid to tomato shoots. The nature of antagonism was competitive in the leaves. The possible role of this antagonistic factor in the anti-toxic defence reactions of the host plants is discussed.

The toxicity of fusaric acid to a wide range of organisms is due to its competitive inhibition of the action of a metabolite. It seems likely that this metabolite, which has not yet been isolated in the pure form, is most probably structurally analogous to fusaric acid. Its molecule has possibly undergone a change in the pyridine ring.

Zusammenfassung

Fusarinsäure (5n-Butyl-Picolinsäure), eines der Welketoxine aus *Fusarium lycopersici,* ist auch ein Antibioticum. *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* werden durch dieses Antibioticum auf synthetischen Nährböden 15mal stärker gehemmt als auf solchen mit Hefe- oder Fleischextrakt.

Die geringere Toxizität der Fusarinsäure wird auf einen antagonistischen Faktor zurückgeführt, der in den beiden Extrakten enthalten ist.

Eine Anzahl bekannter Metaboliten wie Phenole, Vitamine, Purin- oder Pyrimidinbasen wurden auf ihre enthemmende Wirkung geprüft. Keiner der untersuchten Stoffe erwies sich als aktiv.

Der im Hefeextrakt nachgewiesene Antagonist wurde durch Adsorption an Frankonit angereichert. In zweidimensionalen Chromatogrammen konnte er als eine einheitliche Substanz nachgewiesen werden. Die R_f-Werte dieses Stoffes werden für verschiedene Fließmittel angegeben.

Das Verhalten dieses Stoffes bei der Papierchromatographie und an Ionenaustauschern läßt vermuten, daß es sich um eine Säure handelt.

Der Antagonismus zwischen Faktor und Fusarinsäure ist bei *Candida vulgaris, Ustilago sphaerogena, Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* kompetitiv, während er bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* nicht-kompetitiv ist.

Der antagonistische Faktor läßt sich auch in verschiedenen anderen für Nährböden verwendeten Substanzen nachweisen; überdies wird er von *Fusarium lycopersici* und *Colletotrichum fuscum* gebildet.

Der Antagonist hebt nicht nur die Wirkung der Fusarinsäure, sondern auch diejenige von anderen toxischen Pyridinderivaten auf.

Der Antagonist konnte die Giftigkeit der Fusarinsäure in Tomatensprossen teilweise aufheben. Die antagonistische Wirkung zeigte sich in Blättern als kompetitiv. Die vermutliche Rolle dieses Antagonisten bei den Abwehrreaktionen der Wirtspflanzen wird diskutiert.

Die Giftwirkung der Fusarinsäure gegen verschiedene Organismen beruht darauf, daß sie einen essentiellen Metaboliten zu ersetzen und so dessen Wirkung kompetitiv aufzuheben vermag. Wahrscheinlich ist dieser Metabolit, der sich bisher noch nicht rein darstellen läßt, der Fusarinsäure strukturell analog. Es ist zu vermuten, daß der Metabolit im Vergleich zur Fusarinsäure einen kleinen Unterschied im Pyridinring aufweist.

Acknowledgements

I wish to acknowledge my grateful thanks to Prof. Dr. E. Gäumann for his advice, encouragement and help in many ways. I express my profound thanks to Dr. H. Kern for his konstant help und suggestions in the course of this investigation, and my special gratitude to Mr. R. Braun for the critical perusal of the manuscript and suggestions. For much technical assistance in the preparation of this paper I thank Miss D. Clark and Mr. P. Studer.

To the authorities of the Volkart-Stiftung in Winterthur (Switzerland) I wish to express my thanks for the award of a Scholarship.

I have to thank many of my colleagues in the Institute for help in many ways.

Literature cited

BACHMANN, E., 1956: Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z. **27**, 255—288.

— —, 1957: Über den Einfluß von Pyridin und Pyridin-Derivaten auf die Wasserpermeabilität von *Spirogyra nitida* und *Rhoeo discolor*. Phytopath. Z. **29**, 177—184.

BOSSI, R., 1960: Über die Wirkung der Fusarinsäure auf die Polyphenoloxydase. Phytopath. Z. **37**, 273—316.

BRAUN, A. C., 1955: A study on the mode of action of the wildfire toxin. Phytopathology **45**, 659—664.

DEUEL, H., 1954: Über Störungen des Spurenelementhaushaltes der Pflanzen durch Welketoxine. Phytopath. Z. **21**, 337—348.

GÄUMANN, E., 1951: Some problems of pathological wilting in plants. Advanc. Enzymol. **2**, 401—435.

— —, 1957: Fusaric acid as a wilt toxin. Phytopathology **47**, 342—357.

— —, 1958: The mechanism of fusaric acid injury. Phytopathology **48**, 670—686.

— —, und W. LOEFFLER, 1957: Über die Wirkung von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität der Markzellen von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **28**, 319—328.

— —, ST. NAEF-ROTH und H. KOBEL, 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **20**, 1—38.

GROBBELAAR, N., J. K. POLLARD and F. C. STEWARD, 1955: New soluble nitrogen compounds (Amino- and Imino-acids and amides) in plants. Nature **175**, 703—707.

HAENEL, H., 1956: Quantitativer Nachweis eines kompetitiven Antagonismus in Keimringtest mit *Phycomyces blakesleeanus*. Vitamin und Hormone **7**, 122—123.

JUILLARD, M., 1957: Über die Cobalamine einer Mutante von *Bacillus megaterium* De Bary. Zbl. Bakt. Abt. II, **110**, 701—727.

KALYANASUNDARAM, R., und R. BRAUN, 1958: Über die Probleme der Baumwollwelke. Phytopath. Z. **33**, 321—340.

— —, and C. S. VENKATA RAM, 1956: Production and systemic translocation of fusaric acid in *Fusarium* infected cotton plants. J. Indian. bot. Soc. **35**, 7—10.

KERN, H., und D. KLUEPFEL, 1956: Die Bildung von Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici* in vivo. Experientia **12**, 181—182.

KLUEPFEL, D., 1957: Über die Biosynthese und die Umwandlungen der Fusarinsäure in Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **29**, 349—379.

LAKSHMINARAYANAN, K., and D. SUBRAMANIAN, 1955: Is fusaric acid a vivotoxin? Nature **176**, 697—698.

LINSKENS, H. F., 1955: Papierchromatographie in der Botanik. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 253 S.

NAEF-ROTH, ST., und P. REUSSER, 1954: Über die Wirkung der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von Tomatenblattgewebe. Phytopath. Z. **22**, 281—287.

PAGE, O. T., 1959: Fusaric acid in banana plants infected with *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. Phytopathology **49**, 230—231.

REUSSER, P., und ST. NAEF-ROTH, 1956: Über den Einfluß der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von *Saccharomyces cerevisiae* Hans. Phytopath. Z. **26**, 273—296.

WILLIAMS, R. T., 1949: Detoxication mechanisms. 2nd Edition, Wiley, New York, 288 S.

WOODS, D. D., 1940: The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of action of sulphanilamide. Brit. J. exp. Path. **21**, 74—89.

— —, and R. G. TUCKER, 1958: The relation of strategy to tactics: Some general biochemical principles. Symp. Soc. gen. Microbiol. **8**, Cambridge Univ. Press, 1—29.

WOOLLEY, D. W., 1952: A study of antimetabolites. John Wiley, London, 269 S.

Aus dem Forstbotanischen Institut, München,
und dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Über die Hemmwirkung des Gynäzeums bei *Primula obconica* auf Bakterien und Pilze

II. Versuche zur chemischen Isolierung der Narbenhemmstoffe

Von

J. Jung und M. Plempel

In einer früheren Arbeit (Jung 1956) wurde gezeigt, daß die weiblichen Blütenorgane verschiedener Pflanzen mit präformierten bakteriostatischen bzw. fungostatischen Stoffen ausgestattet sind.

In der vorliegenden Arbeit wird über Isolierung und Nachweis zweier Narbenhemmstoffe von *Primula obconica* berichtet.

1. Chemische Aufarbeitung der weiblichen Blütenorgane

a) Rohextraktgewinnung

Zur Gewinnung des Blütenrohextraktes werden die weiblichen Blütenorgane (Narbe, Griffel und Fruchtknoten) von *Primula obconica* im Potterkolben (Potter und Elvehjem 1936) homogenisiert und im Scheidetrichter durch Ausschütteln mit Äthyläther extrahiert. Der Rohextrakt wird am rotierenden Vakuumverdampfer, bei dem eine sehr rasche Verdampfung organischer Lösungsmittel durch kontinuierliche Erzeugung eines dünnen Lösungsmittelfilmes im Wasserstrahl-Vakuum erreicht wird, bis zur Trockne eingeengt.

b) Rohextraktaufarbeitung

Der Rohextrakt wird verteilungschromatographisch an Kieselgur in fünf Fraktionen aufgetrennt. Die Kieselgursäule besteht in der Unterphase aus 10 g Kieselgur, die mit 7 ml 0,3 mol. Phosphatpuffer pH 5,8 gut durchmischt wird, in der Oberphase aus 5 g Kieselgur, 3,5 ml 0,3 mol. Phosphatpuffer und dem Rohextrakt. Unter- und Oberphase werden nacheinander in eine 38 cm lange und 1,8 cm i. D. weite Chromatographierröhre gestopft und der Rohextrakt mit den Lösungsmitteln Petroläther, Benzol, Äther, Essigester und

Azeton verteilt; diese werden in Vorlagen aufgefangen und nach dem Agardiffusionstest (JUNG und STOLL 1957), bei welchem gewebeextraktgetränkte Filterpapierscheibchen auf Agarplatten ausgelegt werden, die gleichzeitig mit einer Sporensuspension beimpft werden, auf ihre Pilz- bzw. Bakterienhemmwirkung geprüft.

2. Nachweis zweier Primelhemmstoffe

7,9 mg Substanz/ml Lösungsmittel Ätherrohextrakt ergeben nach dem Agardiffusionstest 13 mm breite Hemmzonen. Nach der verteilungschromatographischen Aufbereitung des Rohextractes zeigen die Petroläther- und die Essigesterfraktion ein positives, die Benzol-, Äther- und Azetonfraktion ein negatives Ergebnis. Aus der Petrolätherfraktion ergeben 2,25 mg Substanz/ml Lösungsmittel eines vorgereinigten Hemmstoffes 9 mm breite Hemmzonen, während 900 γ Substanz/ml Lösungsmittel eines anderen Hemmstoffes aus der Essigesterfraktion 7 mm breite Hemmzonen ergeben.

a) Adsorptionschromatographische Reinigung des Hemmstoffes aus der Petrolätherfraktion

Der Hemmstoff aus der Petrolätherfraktion wird adsorptionschromatographisch an Aluminumoxyd weiter gereinigt. Als Adsorbens wird Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufe III verwendet. Es wird in eine 38 cm lange und 0,8 cm i. D. weite Chromatographierröhre mit Petroläther (30 bis 40 °C) so eingespült, daß die Säule keine Luftblasen oder Risse aufweist; die getrocknete Analysensubstanz wird in 2 ml Petroläther (30 bis 40 °C) gelöst und ebenfalls in die Röhre eingefüllt. Das obere Ende der Säule wird mit Filtrierpapier abgedeckt, um ein Aufwirbeln des Adsorbens zu verhindern. Eine erste, gelbe Bande wird mit 10 ml Petroläther (30 bis 40 °C) von der Substanz abgetrennt und mit 6 ml des gleichen Lösungsmittels ausgewaschen.

Mit 8 ml Lösungsmittelgemisch Petroläther (30 bis 40 °C und 40 bis 60 °C) im Verhältnis 1 : 1 trennen sich zwei weitere, sehr langsam wandernde Banden ab. Eine schwach gelbe zweite Bande wird mit 10 ml Petroläther (40 bis 60 °C) von der dritten Bande deutlich abgetrennt und mit 10 ml Lösungsmittelgemisch Petroläther (40 bis 60 °C und 80 bis 100 °C) im Verhältnis 1 : 1 aus der Säule gewaschen. Die dritte Bande wandert mit 8 ml Petroläther (80 bis 100 °C) langsam. Mit 10 ml Lösungsmittelgemisch Petroläther (80 bis 100 °C) und Benzol lösen sich vom Start eine vierte gelbe und eine fünfte rosa farbige Bande. Mit diesem Gemisch wird die dritte Bande, die vierte mit Benzol und die fünfte mit Azeton ausgewaschen. Die getesteten Substanzen aus den Banden zeigen Aktivität bei Bande 4, bei den Banden 1, 2, 3 und 5 keine Hemmwirkung. Bande 4 wird nach der von E. STAHL (1958) entwickelten Dünnschicht-Chromatographie in Benzol und 5 % Azeton nochmals in drei Komponenten aufgespalten, von denen nach der Elution in Benzol und Azeton eine gelbe Bande im Agardiffusionstest hoch aktiv ist. Es ergeben 63 γ Substanz/ml Lösungsmittel aus dieser Bande eine 14 mm breite Hemmzone.

b) Niederspannungselektrophoretische Reinigung des Hemmstoffes aus der Essigesterfraktion

Die Abtrennung des Hemmstoffes aus der Essigesterfraktion von anderen Stoffen ist adsorptionschromatographisch unbefriedigend. Dieser wird niederspannungselektrophoretisch gereinigt. Die hemmende Substanz aus der Essigesterfraktion wird auf 32 × 30 cm großen Papierstreifen (Schleicher und Schüll, 2043 b) mit einer Mikropipette als dünner, möglichst gleichmäßiger, etwa 10 cm langer Querstrich aufgetragen und getrocknet. Der gleichmäßig mit einer Boratpufferlösung (pH 11) befeuchtete Papierstreifen wird in die Elektrophoresekammer so eingelegt, daß er mit seinen beiden Enden in die Pufferlösung hängt, die mit Anode und Kathode in Verbindung steht.

Hemmstoffhaltige weibliche Blütenorgane von *Primula obconica*
↓
Homogenisierung
↓
Homogenisat mit Äther extrahieren
↓
Rohextrakt
↓
Verteilungschromatographie an Kieselgur

Fraktionen: Petroläther | Benzol | Äther | Essigester | Azeton

Hemmstoff 1

Adsorptionschromatographische Aufbereitung an Aluminiumoxyd
↓
Es entstehen 5 Banden:
Bande 4 enthält den Hemmstoff
↓
Papierchromatographie in Methanol + 20 % Wasser
↓
im UV-Licht eine dunkelblau fluoreszierende aktive Bande
↓
Eluieren mit Methanol
↓
Dünnschichtchromatographie in Benzol + 5 % Azeton
↓
Es entstehen 3 Banden:
eine gelbe enthält den Hemmstoff
↓
Test: stark +

Hemmstoff 2

Niederspannungselektrophoretische Aufbereitung mit Boratpuffer pH 11
↓
2 anodisch wandernde Banden,
eine rotbraun gefärbt; Test negativ
eine grün gefärbt; Test stark positiv
↓
Eluieren der grünen Bande mit Essigester
↓
Elektrophorese mit Zitratpuffer pH 3,53
↓
eine dunkle, kathodisch wandernde Bande
↓
Eluieren mit Essigester
↓
Dünnschichtchromatographie in Chloroform + 10 % Methylenchlorid
↓
Aktive Bande
↓
Test: stark +

Am Ende dieses Aufarbeitungsganges werden zwei Narbenhemmstoffe als farblose, ölige Substanzen erhalten

Beim Anlegen der Spannung setzt die Elektrophorese ein. Die Laufzeit beträgt 2 bis 3 Stunden. Auf dem getrockneten Pherogramm werden im UV-Licht von 250 mμ zwei deutlich voneinander getrennte, anodisch wandernde Banden sichtbar. Die im Agardiffusionstest aktive Bande ist grün. Zur weiteren Reinigung wird die aktive Bande eluiert und, wie oben angegeben, nochmals der Elektrophorese unterzogen. Als Puffer wird eine Zitratpufferlösung pH 3,53 verwendet. Die nun im UV-Licht violett erscheinende aktive Bande ist von anderen Stoffen abgetrennt und wandert kathodisch.

Die mit Essigester aus dem Pherogramm eluierte Substanz spaltet dünnschichtchromatographisch in Chloroform und 10 % Methylenchlorid in drei im UV fluoreszierende Banden auf, von denen die zwischen Start und Front in der Mitte liegende Bande hohe Aktivität aufweist. Es ergeben 54 γ Substanz/ml Lösungsmittel aus dieser Bande eine 18 mm breite Hemmzone.

Verteilungs- und adsorptionschromatographische Versuche ermöglichen zusammenfassend die schematische Darstellung eines Aufarbeitungsganges auf S. 247, der bei größter Schonung zu einer beträchtlichen Anreicherung der Hemmstoffe führt:

Der Anreicherungsgrad der mit Methanol bzw. Essigester aus dem Papier eluierten beiden Hemmstoffe wird auf folgende Art ermittelt:

Die aus dem Papier eluierte, im Agardiffusionstest aktive Substanz wird gewogen, mit Äther auf das Ausgangsvolumen der Rohextraktlösung aufgefüllt und getestet. Die erhaltenen Werte werden zu den Testwerten der Trockengewichte des lyophilisierten Rohextraktes in Beziehung gesetzt.

Für den Hemmstoff aus der Petrolätherfraktion ergibt sich auf diesem Wege eine insgesamt 3500fache, für den aus der Essigesterfraktion eine 4000-fache Anreicherung.

Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wird über die Gewinnung und den Nachweis zweier verschiedener Narbenhemmstoffe von *Primula obconica* berichtet.

2. Die verteilungschromatographische Aufbereitung des Blütenrohextraktes an Kieselgur ergibt einen Hemmstoff in der Petrolätherfraktion und einen Hemmstoff in der Essigesterfraktion.

3. Es wird eine Methode beschrieben, um zwei verschiedene Narbenhemmstoffe von *Primula obconica* in angereicherter Form zu gewinnen.

4. Der Hemmstoff aus der Petrolätherfraktion wird 3500fach, der aus der Essigesterfraktion 4000fach angereichert.

Summary

1) In the present work a report is given on the isolation and detection of two different inhibitory substances in the stigma of *Primula obconica*.

2) Chromatographic separation of the flower extract on kieselguhr shows one inhibitor in the petroleum-ether fraction and one in the acetic-ester fraction.

3) A description is given of a method whereby two inhibitory substances in the stigma of *Primula obconica* can be extracted in concentrated form.

4) The inhibitor from the petroleum-ether fraction can be concentrated 3500 times and that from the acetic-ester fraction 4000 times.

Hern Professor Dr. A. Butenandt danken wir für die geistige Förderung der Arbeit und die Überlassung aller technischen Hilfsmittel seines Institutes, Herrn Professor Dr. B. Huber für das große Interesse, das er dem Fortgang der Arbeit entgegenbrachte. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat die Arbeit dankenswerterweise finanziell unterstützt.

Literaturverzeichnis

Jung, J., 1956: Sind Narbe und Griffel Eintrittspforten für Pilzinfektionen? Phytopath. Z. **27**, 405—426.

— —, und Chr. Stoll, 1957: Über die Hemmwirkung des Gynäzeums bei *Primula obconica* auf Bakterien und Pilze. I. Über Schwankungen der Hemmintensität. Phytopath. Z. **31**, 180—184.

Potter, U. R., and Elvehjem, 1936: A modified method for the study of tissue oxidations. J. Biol. Chem. **114**, 455.

Stahl, E., 1958: Dünnschicht-Chromatographie. III. Mitt. Parfümerie und Kosmetik **9**.

Aus dem Institut für Angewandte Botanik der Universität Würzburg

Anatomisch-entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an nekrosevirus-infizierter *Fragaria vesca* L.

Von

G. Schöniger

Mit 6 Abbildungen

EINLEITUNG

Das vor einigen Jahren isolierte, nicht persistente Erdbeernekrosevirus = ENV (Schöniger, G. 1958) gehört zu jenen Erdbeerviren, die nur durch Pfropfung oder Vektoren übertragbar sind. Wirtspflanzen sind bisher nur aus der Gattung *Fragaria* bekannt. Die durch das ENV auf dem Testklon *Fragaria vesca*/East Malling hervorgerufenen Symptome sind sehr variabel; jahrelange Beobachtung zeigte, daß sich die Symptommanifestierung in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen von Totalnekrose bis zur völligen Maskierung erstrecken kann.

Wegen dieses stark schwankenden Symptombildes wurden anatomische Untersuchungen begonnen, zunächst mit der Absicht, auf Grund der inneren Veränderungen eine Charakterisierung zu finden, die einheitlich bei den verschiedenen äußeren Symptomen anwendbar wäre. Die Vielfalt der inneren Veränderungen in den extra- und intravaskulären Geweben der ersten Präparate ließ es zweckmäßig erscheinen, die anatomischen Veränderungen in ENV-infizierter *Fragaria vesca* entwicklungsgeschichtlich zu verfolgen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

MATERIAL, METHODEN

Wie bereits erwähnt, gehört das ENV zu den nicht persistenten Viren. Der Vektor *Pentatrichopus fragaefolii* (Ckll.) bleibt im Höchstfall 24 Stunden nach Verlassen der Infektionsquelle infektiv. Die Mindestaufnahmezeit durch den Vektor beträgt 6 Stunden, Übertragung findet bereits in der ersten Stunde nach Verlassen des Infektors statt. Auf Grund dieser vektorspezifischen Eigenschaften kann man unter Berücksichtigung der Arbeiten von Sylvester (1956) das ENV auch als semipersistent bezeichnen.

Primärsymptome treten auf *Fragaria vesca* durchschnittlich nach 4 Wochen auf. Wichtigstes, meist ± deutlich vorhandenes äußeres Merkmal (endgültige Symptome) sind nekroti-

sche Flecke und Strichel an den Blattstielen und -spreiten; Totalnekrose (Primärschock), aber auch völlige Maskierung ist möglich.

Für die anatomischen Untersuchungen wurden ausschließlich Pflanzen des Testklons *Fragaria vesca*/East Malling verwendet. Je nach Erfordernis wurden neuinfizierte oder schon lange Zeit kranke Pflanzen untersucht. Die Infektion erfolgte durch Vektoren.

Alle Versuchspflanzen wurden im Gewächshaus gezogen, das durch regelmäßiges Spritzen mit Systox insektenfrei gehalten wurde. Während der gesamten Versuchsdauer konnten nie Zufalls- oder Fremdinfektionen beobachtet werden. Das Versuchshaus wurde im Winter nur bis 5 ° bis 10 °C beheizt, während des übrigen Jahres entsprach die Gewächshaustemperatur ungefähr der Außentemperatur. Da die äußeren Symptome u. a. sehr stark temperaturabhängig sind, standen im Laufe der Zeit genügend Pflanzen mit unterschiedlich starken Symptomen zur Verfügung.

In orientierenden Voruntersuchungen (Hand- und Mikrotomschnitte) konnten in den Wurzeln keine krankhaften Veränderungen beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit umfaßt daher nur die Sprosse, Blätter und die Blütenstände (zum Teil).

Die Beobachtungen erfolgten in der Regel an fixiertem Material, d. h. an Mikrotomschnitten. Soweit technisch möglich, wurden auch Handschnitte von Frischmaterial zum Vergleich herangezogen.

Zur Fixierung wurde ein Alkohol-Eisessig-Formol-Gemisch verwendet (D. A. Johansen 1940). Das Material wurde nach den üblichen Methoden weiterbehandelt, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Schnittdicke betrug je nach Zweckmäßigkeit 5 μ bis 10 μ.

Folgende Färbungen wurden angewandt: Safranin und Lichtgrün, Hämatoxylin nach Heidenhain mit und ohne Safranin als Gegenfärbung, Hämatoxylin nach Delafield. An Blättern und jungen Sproßteilen erhält man mit Safranin und Lichtgrün besonders günstige Resultate. Die vier Stunden in Safranin gefärbten Schnitte müssen allerdings mit Lichtgrün, dem einige Tropfen Salzsäure zugesetzt werden, so stark differenziert werden, daß die verholzten Gefäße nur mehr rosa erscheinen. Es sind dann in der Regel nur krankhaft veränderte Zellbestandteile ± kräftig rot gefärbt. Da diese Färbung in den meisten Fällen angewandt wurde, beziehen sich in der Versuchsbeschreibung Ausdrücke wie „stark gefärbt", „chromophil", u. ä. ohne besonderen Zusatz immer auf Safranin. An älteren Sprossen gab Hämatoxylin nach Delafield die günstigsten Färbungen.

BEOBACHTUNGEN AM VERSUCHSMATERIAL

1. Blattanlagen der Haupt- und Seitenachsen

Die Entwicklung der Blätter an den Haupt- und Seitenachsen wurde von Arney und Guttridge ausführlich behandelt (Arney, S. E. 1953, Guttridge, C. G. 1955). Da im Versuchsmaterial keine Abweichungen von den Ergebnissen der genannten Autoren gefunden wurden, erübrigte sich eine neuerliche Untersuchung.

Für die Untersuchung der Blattanlagen wurden in der Regel neuinfizierte Pflanzen zum Zeitpunkt des Einsetzens der Primärsymptome verwendet. Aus den makroskopischen Beobachtungen ist nämlich bekannt, daß einerseits an den Blattanlagen nie Symptome vorkommen, daß aber andererseits bei entsprechenden Umweltbedingungen nicht nur das Primärsymptomblatt besonders stark reagiert, sondern noch drei bis vier Blätter nach ihm. Wenn daher innere Veränderungen in den Blattanlagen überhaupt vorkommen, dann mit größerer Wahrscheinlichkeit in neuinfizierten als in schon lange Zeit kranken Pflanzen. Nur für die Beobachtungen an den ruhenden Knospen (= nicht zur Entwicklung gekommene Seitenachsen) stellten Pflanzen, die schon durch mehrere Monate hindurch krank waren, das Material.

Die Sprosse wurden fixiert, wenn sich das erste symptomtragende Blatt zu entfalten begann. Am Sproßscheitel findet man in der Regel fünf Blattanlagen verschiedener Größe, die von den Stipeln des jüngsten entfalteten Blattes eingeschlossen werden. Um schnelleres und damit besseres Fixieren zu ermöglichen, wurden die ältesten (= fünften) Blattanlagen ganz und die vierten bis auf die Stipeln unter dem Präpariermikroskop entfernt und als Einzelteile weiterbehandelt.

a) Hauptachsen: Im Meristem des Sproßscheitels und in den beiden jüngsten Blattanlagen konnten nie Unterschiede zu den Kontrollen gefunden werden.

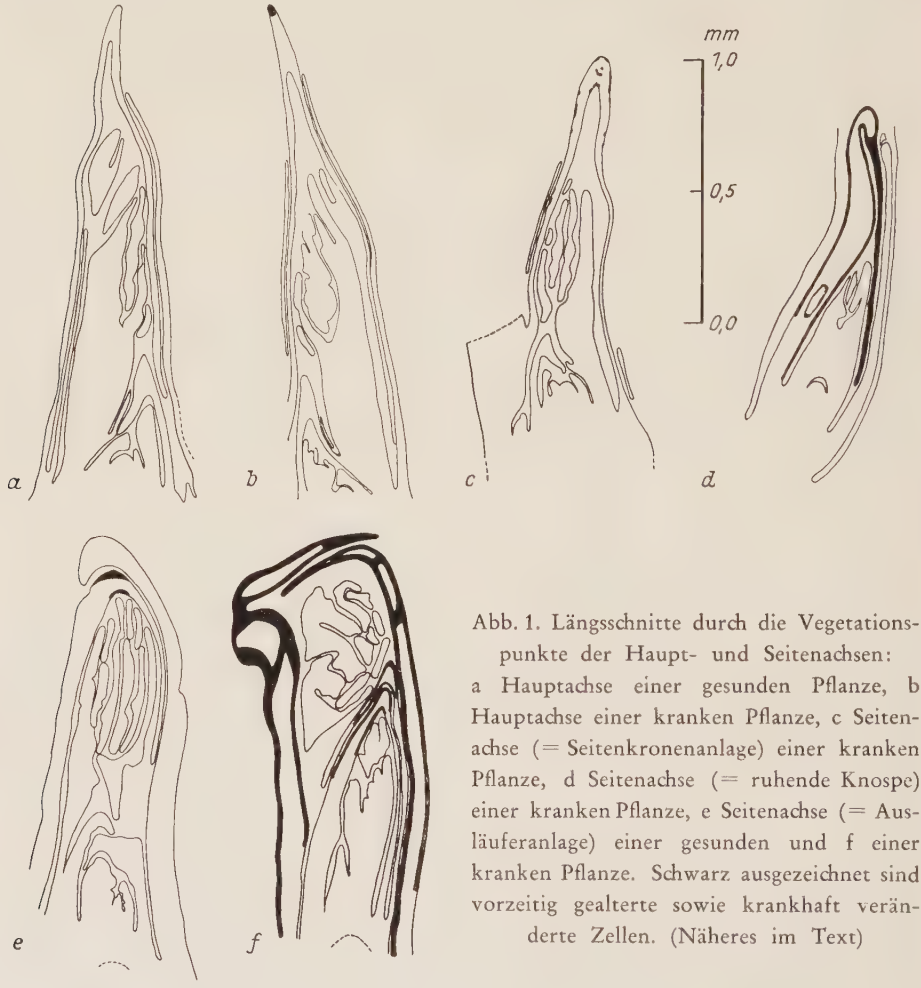


Abb. 1. Längsschnitte durch die Vegetationspunkte der Haupt- und Seitenachsen: a Hauptachse einer gesunden Pflanze, b Hauptachse einer kranken Pflanze, c Seitenachse (= Seitenkronenanlage) einer kranken Pflanze, d Seitenachse (= ruhende Knospe) einer kranken Pflanze, e Seitenachse (= Ausläuferanlage) einer gesunden und f einer kranken Pflanze. Schwarz ausgezeichnet sind vorzeitig gealterte sowie krankhaft veränderte Zellen. (Näheres im Text)

Erst in der drittältesten Blattanlage, die schon deutliche Differenzierung in Nebenblätter, Blattstiel und -spreite zeigt, konnten Differenzen zwischen infizierten und gesunden Pflanzen festgestellt werden, doch nur an einem

unter sechs geprüften Fällen (Abb. 1 b). Einige Epidermiszellen des Unterblattes hatten auffallend dichtes, stark lichtgrün gefärbtes Plasma. Andere, offensichtlich schon stärker betroffene zeigten rotgefärbte Nukleolen bzw. Zellkerne, oder der gesamte Zellinhalt war stark nach Safranin gefärbt. Gesunde Pflanzen haben in den entsprechenden Zellen Kern und Plasma nur schwach durch Lichtgrün tingiert. Die Zellvakuolen sind sowohl in kranken als auch gesunden Pflanzen hier noch kaum kenntlich.

In den Stipeln der nächst älteren (= vierten) Blattanlagen können entsprechend veränderte Zellen gefunden werden. Hier besitzen die Epidermiszellen schon einen zentralen Saftraum; neben Kern und Plasma kann unter Umständen auch der Vakuoleninhalt ± stark gefärbt sein.

In den ältesten (= fünften) Blattanlagen können in seltenen Fällen außer in den Stipeln gleichartig veränderte Epidermiszellen auch in den Zähnchen der Blattspitzen auftreten.

In den Infloreszenzanlagen, die bei *Fragaria* terminal entstehen und nach deren Inzeption die nächstliegende Seitenachse das Sproßwachstum fortsetzt, konnten nie Unterschiede zu den Kontrollen gefunden werden. Allerdings stand in diesem Fall weniger Material zur Verfügung.

b) Seitenachsen: Seitenachsen werden in regelmäßiger Folge in den Blattachseln angelegt; meist kann man sie schon an der Basis des zweiten Blattprimordiums erkennen. Die Achselknospen können zu Seitenkronen oder Ausläufern werden. Die Anlage der Seitenachsen wird durch ENV-Infektion nicht beeinträchtigt. Vergleich zwischen gesunden und kranken Pflanzen zeigt, daß bei letzteren allerdings die Seitenkronenanlagen im Wachstum zurückbleiben; für die Ausläuferanlagen trifft dies nicht zu.

Seitenkronenanlagen aus der Terminalknospe neuinfizierter Pflanzen zeigen Veränderungen nach Art der Hauptachsen in den entsprechenden Blattanlagen, allerdings in etwas stärkerem Ausmaß. Außerdem sind Zellen unmittelbar neben den Leitbündeln in ähnlicher Weise betroffen (Abb. 1 c). In den ruhenden Knospen sehr lange kranker Pflanzen sind derartige Veränderungen in einer noch größeren Anzahl Zellen an den gleichen Stellen zu finden, auch können zusätzlich im Mesophyll nahe einem Leitbündel irreguläre Zellteilungen auftreten (Abb. 1 d). Zum besseren Verständnis der Abbildungen 1 c und d sei erwähnt, daß Seitenkronenanlagen das älteste Blattprimordium ± bis auf die Stipeln reduziert haben, und zwar in Abhängigkeit von ihrer Stellung zur Infloreszenz (Guttridge, C. G. 1955).

Ausläuferanlagen kranker Pflanzen verhalten sich erwartungsgemäß ganz ähnlich wie Seitenkronenanlagen. Die Epidermiszellen der beiden ältesten Blattanlagen (bei Ausläufern als Schuppenblätter ausgebildet) sind zum Großteil, die der Stipeln des ersten trifoliaten Blattes noch in bemerkenswerter Anzahl betroffen. In den Schuppenblättern zeigen Parenchymzellen, besonders nahe den Leitbündeln, gleichartige Veränderungen (Abb. 1 f). Bei den Kontrollen konnten unter Umständen in der Epidermis der Schuppenblätter einige Zellen gefunden werden, die gleiche Veränderungen aufwiesen wie die kranker Pflanzen (Abb. 1 e).

Vergleicht man die Veränderungen in den Blattanlagen der Haupt- und Seitenachsen untereinander und nimmt neben gleichalten auch ältere Kontrollblätter hinzu, kommt man zu folgenden Feststellungen:

Die ersten Veränderungen in den Blattanlagen sind an ein bestimmtes Zellalter gebunden. Die unterschiedlich starke Ausprägung in einer Blattanlage bestimmter Ordnung hat ihren Grund darin, daß die Zellen dieser Anlage an der Hauptachse einerseits und den Seitenachsen andererseits in der Differenzierung verschieden weit fortgeschritten sind. An der Vakuolisierung der Epidermis- und Mesophyllzellen, besonders aber an der Ausbildung der vaskulären Zellen ist dies gut zu beobachten. In den vierten Blattanlagen der Ausläufer und der ruhenden Knospen haben z. B. im Hauptleitbündel der Stipeln ein bis zwei Gefäße ihre Entwicklung bereits abgeschlossen, d. h. sie zeigen spiralig verstärkte, verholzte Zellwände und besitzen keinen plasmatischen Inhalt. Bei den jungen Seitenkronenanlagen setzt die Verholzung in den entsprechenden Zellen eben ein und in den Blattanlagen der Hauptachsen sind diese Xylemelemente noch ausgesprochen juvenil.

Veränderungen in der Epidermis können in ganz ähnlicher Form nicht nur an jungen, entfalteten Blättern gesunder Pflanzen beobachtet werden, sondern in geringem Ausmaß auch an den ältesten Blattanlagen der Kontrollausläufer. Die Zellen dieser Schuppenblätter sind aber physiologisch älter als die entsprechenden Zellen in den Blattanlagen gleicher Ordnung in den anderen Knospen. Es ist durchaus denkbar, daß in der Epidermis kranker Pflanzen nur vorzeitige Alterserscheinungen auftreten, also keine virusspezifischen Symptome.

Veränderungen in den Zellen nahe den Leitbündeln sind hingegen nur infizierten Pflanzen eigen. Sie treten nur dann auf, wenn die ersten Tracheen ein fortgeschrittenes Entwicklungsstadium erreicht haben.

Irregulär geteilte Zellen im Parenchym sind ebenfalls als typisches Symptom zu werten; man findet sie oft als sekundäre Veränderung in älteren Blättern und Sprossen.

2. Jugendliche Blätter

In diesem Abschnitt werden die Veränderungen unentfalteter sowie eben entfalteter Jungblätter beschrieben. Im unentfalteten Blatt findet man zum Teil noch Zellteilungen im Assimilationsparenchym. Nach dem Entfalten kommen in der Regel außerhalb der meristematischen Zonen der Leitbündel keine Teilungen mehr vor, doch nehmen die Zellen noch beträchtlich an Volumen zu, bevor die Blätter ihre endgültige Größe erreichen. Bei diesen und allen weiteren Blättern wurden die Stipeln nicht mehr in die Untersuchung einbezogen.

In den unentfalteten Blättern ENV-infizierter Pflanzen findet man dieselben Veränderungen wie in den ältesten Blattanlagen: Epidermiszellen in den Blattzähnchen in allen Zellbestandteilen ± durch Safranin gefärbt. Gelegentlich sind an diesen Stellen auch einige Mesophyllzellen in Mitleidenschaft gezogen, in denen dann die Chloroplasten ebenfalls ± gefärbt sind.

In den Blattzähnchen älterer Kontrollblätter kann man gleichartige Veränderungen beobachten.

Jungblätter zur Zeit des Entfaltens wurden an verschieden behandelten Versuchspflanzen untersucht. Einmal waren es Blätter von Pflanzen, die schon durch lange Zeit relativ starke endgültige Symptome zeigten (Versuch I), zum anderen waren es Primärsymptomblätter aus einem schwach und einem stark reagierenden Versuch (Versuche II und III). Im Versuch I traten also makroskopisch sichtbare Nekrosen frühzeitig an den Blattstielen und -adern auf, wenn auch nicht unmittelbar nach Entfalten des Blattes. In den Versuchen II und III zeigten die Blätter ± stark die typischen Primärschocksymptome: Verbiegung, Verkleinerung und (nur III) relativ helle Blattfarbe.

In den Blattstielen der Pflanzen aus Versuch I und II konnten mitunter in den Leitbündelscheiden einzelne schwach hypertrophe Zellen gefunden werden, deren Plasma oder gesamter Zellinhalt ± chromophil war. Außerdem traten im Parenchym an einzelnen Stellen in gehäufter Zahl Zellen mit leicht deformierten und ± stark gefärbten Kernen auf. Derartig veränderte Zellen findet man zwar auch im Parenchym der Kontrollen, doch sind sie hier gewissermaßen regelmäßig im Parenchym verteilt und außerdem viel geringer an Zahl.

In den Blattspreiten treten im Parenchym nahe den Hauptadern ähnliche Veränderungen wie in den Blattstielen auf. Auch die Parenchymscheiden längs der kleinen Adern können erste Anzeichen krankhafter Veränderung zeigen: stark färbbare Einschlußkörper in Nukleolengröße, schwach chromophiles Plasma und chromophile Chloroplasten, sowie ± stark gefärbten, homogenen oder granulären Vakuoleninhalt. Außerdem fällt auf, daß mitunter nahe den größeren Adern im Vergleich zu den Kontrollen das Assimilationsparenchym in der Entwicklung etwas zurückgeblieben ist: die Interzellularen sind auffallend klein oder fehlen überhaupt.

In den Blättern des Versuchs III (stark reagierende Neuinfektion) treten die Veränderungen zwar an den gleichen Stellen auf, doch unterscheiden sie sich in mancher Hinsicht von denen der anderen Versuche.

Im Blattstiel kann man in und unmittelbar neben den Leitbündelscheiden weniger hypertrophe als vielmehr zahlreiche geteilte Zellen finden (Abb. 2 a), und zwar meist nur bei einem der beiden Seitenleitbündel. Irregulär geteilte Zellen kommen außerdem in und neben krankhaft verändertem Parenchym vor.

Die Veränderungen im Parenchym unterscheiden sich typisch und nicht nur graduell von den Kontrollen. In Kontrollpflanzen läßt sich selbst bei stark veränderten Zellkernen die ± rot gefärbte Kernsubstanz noch immer vom umgebenden, lichtgrün gefärbten Plasma abgrenzen (Abb. 2 e). Die Zellkerne infizierter Pflanzen hingegen werden nicht nur in zunehmendem Maße chromophil, sondern sie degenerieren auch gleichzeitig zu einer ± blasigen Masse, die tiefrot gefärbte Granula enthalten kann (Abb. 2 b, c). Gleichzeitig erhält das Plasma ein schaumiges Aussehen und nimmt an Färbbarkeit zu; die Grenzen zwischen Kern und Plasma werden immer

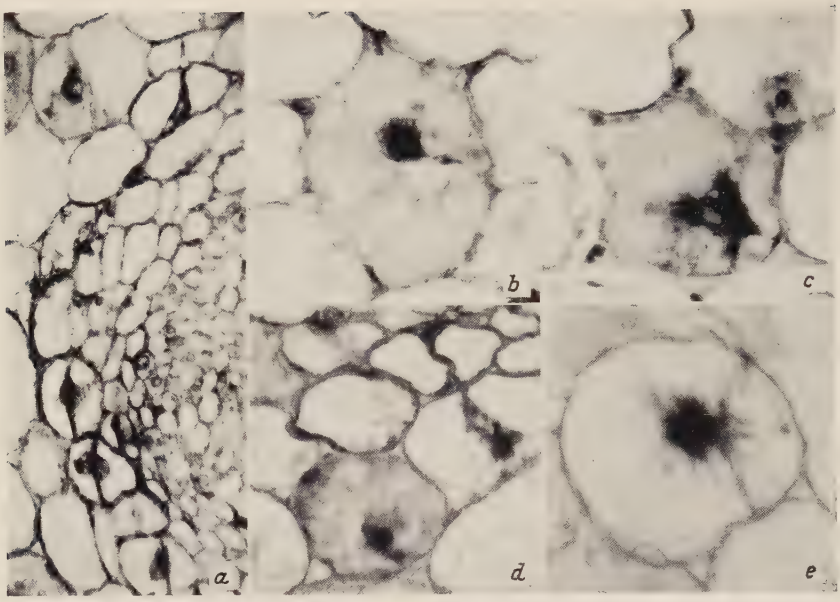


Abb. 2. Blattstielquerschnitte — junges Blatt: a Teilungen in und neben der Leitbündelscheide, b bis e Kernveränderungen. a bis d kranke Pflanzen, e Kontrolle, hier wurden zwei Einstellungen übereinander aufgenommen, um möglichst alle Abweichungen von der normalen Form zu erfassen

undeutlicher (Abb. 2 c, d). Die Interzellularen zwischen diesen Zellen sind teils oder ganz mit chromophilem Material erfüllt (Abb. 2 b, c). Die Zellwände zeigen keinen Unterschied zu den Kontrollen.

Obwohl sehr oft ganze Zellgruppen mit offensichtlich irregulär geteilten Zellen beobachtet wurden, waren doch nie Mitosestadien zu finden. Häufig hingegen waren in diesen Zonen Zellen, in denen sich das meist schon stark gefärbte Plasma als ± breites Band quer durch die Zelle zog. Man hat den Eindruck, daß es sich hier um frühe Teilungsstadien handelt (Abb. 2 d); doch zeigten auch diese Zellen nie das geringste Anzeichen einer Mitose.

Im Leitbündel können im Siebteil und in der meristematischen Zone in einzelnen Zellen stark gefärbte, kugelige Einschlüsse von Größe der Nukleolen oder wenig größer als diese vorkommen; in der Regel sind es nur wenige je Zelle. Das Plasma oder der gesamte Inhalt dieser Zellen kann außerdem ± stark gefärbt und granulär erscheinen. Eine Bevorzugung bestimmter Phloemelemente ließ sich nicht feststellen. Veränderungen in den Leitbündeln waren nur an solchen Stellen zu finden, an denen die Leitbündelscheide und das nahegelegene Parenchym schon Veränderungen aufwiesen.

In den Blattspreiten traten die gleichen Veränderungen auf wie in den Versuchen I und II. In seltenen Fällen konnten außerdem auch vollausdifferenzierte Zellen des Assimilationsparenchyms stark gefärbte Zellkerne zeigen, wobei alle übrigen Zellbestandteile ebenfalls ± stark gefärbt waren.

Zusammenfassend kann für die Veränderungen im jugendlichen Blatt (Oberblatt) festgestellt werden:

Solange das Blatt unentfaltet ist, treten im Blattstiel keine Veränderungen auf. In den Spreiten sind gelegentlich zytologische Veränderungen anzutreffen; sie sind nicht spezifisch für ENV-Infektion, sondern machen den Eindruck vorzeitigen Alterns.

Erste, mit keinem Entwicklungsstadium der Kontrollen vergleichbare Veränderungen können im eben entfalteten Jungblatt vorkommen, und zwar im Parenchym und in den Leitbündelscheiden des Stieles sowie im Assimilationsparenchym (Entwicklungshemmung) und in den Parenchymscheiden der Spreite. Bei symptomfördernden Umweltbedingungen sind die Veränderungen im Stiel des Primärsymptomblattes besonders auffallend, und es können zusätzliche Symptome in den Leitbündeln sowie im Assimilationsparenchym der Spreiten auftreten.

Die Leitbündel der Petiolen zeigen nur nahe, bzw. nach den Veränderungen in dem Parenchym Symptome.

Die Veränderungen im Blattstiel können über die ganze Länge des Stieles verteilt auftreten, jedoch oft nur auf einer Seite zwischen Neben- und Hauptleitbündel bzw. nur auf dieser Seite in den Leitbündeln selbst. Das Blättchen, dessen Adern Fortsetzungen der „bevorzugt veränderten" Leitgewebe sind, zeigt in der Regel Symptome im Assimilationsparenchym bzw. in den Parenchymscheiden. Die Veränderungen treten in kleineren oder größeren Zellkomplexen auf, stehen untereinander nicht in Verbindung und zeigen — außer in der oben erwähnten Beziehung — keinen bevorzugten Entstehungsort.

3. Erwachsene Blätter

In diesem Abschnitt sind alle jene Blätter zusammengefaßt, die außerhalb der Leitbündel keine Teilungen mehr aufweisen und deren Zellen höchstens geringfügige Größenzunahme zeigen.

Gemäß den makroskopischen Befunden entstehen krankhafte Veränderungen in diesen Blättern unabhängig vom Blattalter; je nach Umweltbedingungen setzen sie früher oder später ein. Bezüglich der Lage im Blatt zeigt zwar oft die Ansatzstelle der Blattstielchen Nekrosen, doch müssen die inneren Symptome hier keineswegs zuerst auftreten. In den Spreiten bilden sich die Nekrosen gleichzeitig mit denen im Stiel; hier sind die Hauptadern und die Nebenadern erster Ordnung offensichtlich bevorzugter Entstehungsort.

Wie Serienschnitte an frischem Material zeigen, beginnen die Nekrosen im Blattstiel mit Veränderung einzelner Zellen oder kleiner Zellgruppen im Parenchym. Anschließend an diese zeigen immer neue Zellen krankhaftes Verhalten. Unabhängig von ihnen können im gesund erscheinenden Parenchym neue Nekrosenherde entstehen. Die immer größer werdenden, krankhaft veränderten Zellkomplexe fusionieren z. T., und schließlich werden früher oder später auch die Leitbündel und die als Assimilationsparenchym ausgebildeten subepidermalen Zellschichten betroffen.

Beobachtungen an Mikrotomschnitten lassen erkennen, daß auch im voll ausdifferenzierten Parenchym zunächst Kern und Plasma zunehmend chromophil werden. Allerdings unterbleibt meist die Kerndeformierung und -auflösung. Die weiteren Veränderungen verlaufen in den einzelnen Parenchymzellen nicht mehr einheitlich. In manchen Zellen liegt das im Laufe der Zeit immer stärker färbbare Plasma im Endstadium als ± dicker, u. U. auch granulärer Belag der Zellwand an; der Vakuoleninhalt kann dabei gleichzeitig an Färbbarkeit zunehmen oder ungefärbt bleiben. In diesem Fall sind Zellkerne und Chloroplasten meist deutlich als besonders intensiv gefärbte Körper zu erkennen. In anderen Zellen kann die Grenze zwischen Plasma und Vakuole frühzeitig verschwinden; das gesamte Zellumen ist dann von einer einheitlich gefärbten, ± granulären Masse erfüllt. Die erste Art der Ver-

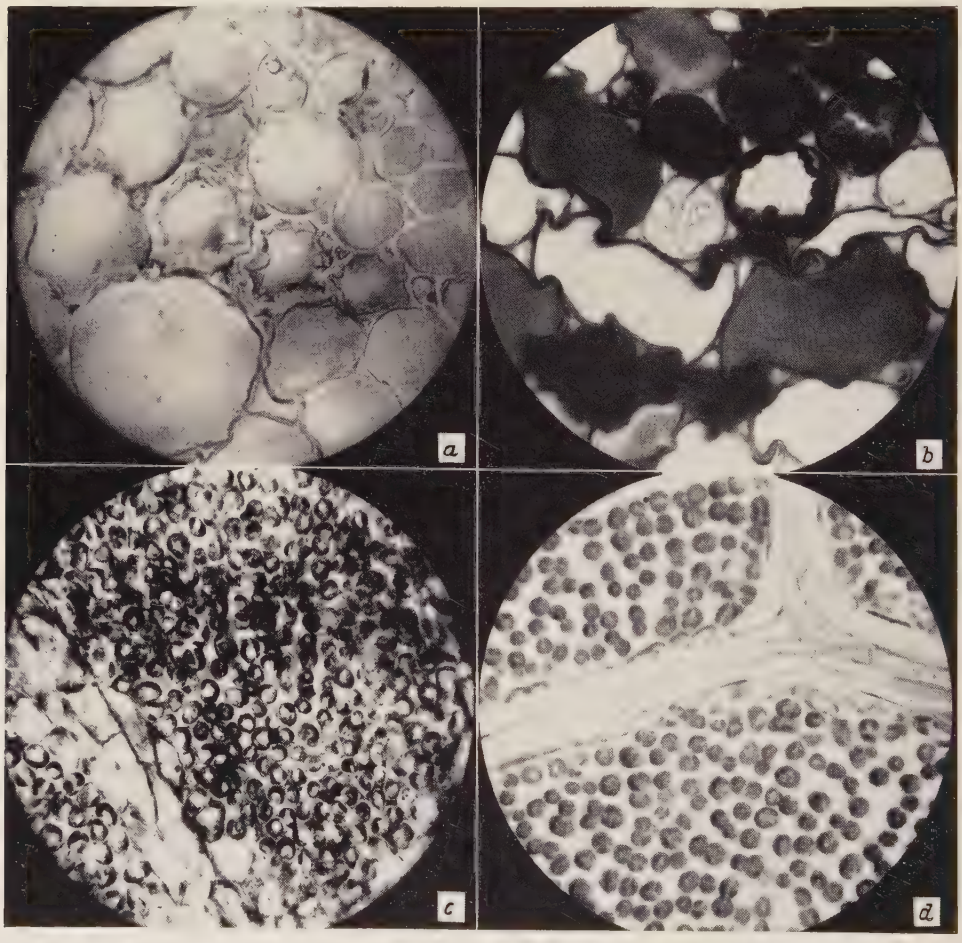


Abb. 3. Erwachsenes Blatt: a, b ENV-bedingte Veränderungen im Parenchym des Stieles (a unfixiertes, b fixiertes Material; Querschnitte), c sehr stark verändertes Palisadenparenchym (Spreite — Flächenschnitt) und d Kontrolle zu 3 c

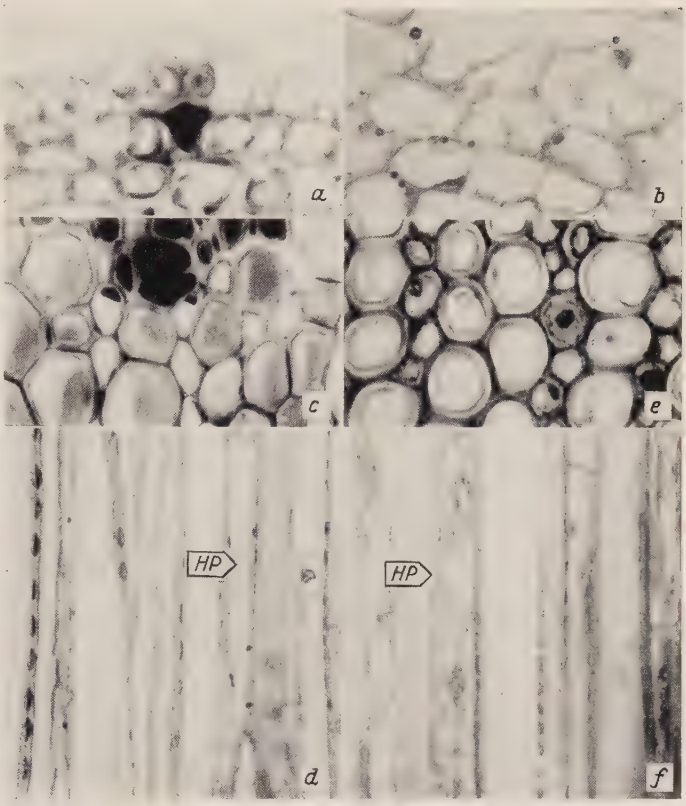


Abb. 4. Erwachsenes Blatt: a Spaltöffnung im Stiel (Querschnitt), b Einschlüsse im Parenchym nahe der Hauptader eines Blättchens (Querschnitt), c, d schwach verändertes Xylem (Quer- und Längsschnitt), e, f Xylem einer gesunden Pflanze (Quer- und Längsschnitt; der Querschnitt wurde mit einem anderen Filter aufgenommen, da sonst zu kontrastarm). HP = Holzparenchymzellen

änderung findet man häufiger in den subepidermalen Zellschichten, die zweite meist im leitbündelnahen Parenchym (Abb. 3 a, b).

Sowie in den Parenchymzellen die Färbbarkeit des Plasmas zunimmt, manchmal sogar schon vorher, kann in den Interzellularen stark chromophiles Material auftreten. Diese Substanz muß zumindest anfänglich ± flüssigen Charakter haben: Solange die Interzellularen von ihr noch nicht ganz erfüllt sind, findet man sie in Form kleiner Tröpfchen (Abb. 3 b). Die Atemhöhlen verhalten sich diesbezüglich genau wie die anderen Interzellularen (Abb. 4 a). Nicht selten kann man beobachten, daß Schließzellen und Atemhöhlen schon Veränderungen zeigen, obwohl naheliegende Parenchymnekrosen noch nicht bis zur subepidermalen Zellschicht vorgedrungen sind.

An der Grenze zwischen gesundem und krankem Parenchym treten mitunter hypertrophe oder ein- bis mehrfach geteilte Zellen auf. Im subepidermalen Assimilationsparenchym und in der Epidermis findet man allerdings diese Erscheinungen selten, dagegen häufig (besonders hypertrophe Zellen) in und unmittelbar neben den Leitbündelscheiden und zwar vor dem Phloem. Beim Größerwerden der späteren Nekrosen verändern sich geteilte und hypertrophe Zellen nach den oben beschriebenen Arten.

Sind schon große Komplexe des Parenchyms und auch der Leitgewebe befallen, können in den epidermisnahen Randzonen der Nekrosen Zellen

ohne Anzeichen einer besonderen krankhaften Veränderung kollabieren. Es ist dies offensichtlich ein reiner Sekundäreffekt: Diese Zellen müssen zugrunde gehen, da sie vom normalen Stoffwechsel abgeschnitten sind.

Da die Leitbündel der Petiolen und der Blattspreiten gleichartige Veränderungen durchlaufen, sollen sie im Anschluß an die Beschreibung der extravaskulären Veränderungen in den Spreiten gemeinsam behandelt werden.

In den Blättchen zeigt das Parenchym nahe den Hauptadern gleiche Veränderungen wie im Blattstiel. Hypertrophe und geteilte Zellen treten allerdings seltener auf. Häufig hingegen findet man nukleolengroße, intensiv gefärbte Einschlußkörper, und zwar auch in den Parenchymscheiden der kleineren Adern. Diese Einschlüsse — meist nur einen je Zelle — kann man vor jeder anderen krankhaften Veränderung beobachten (Abb. 4 b). Wahrscheinlich treten sie nur in Zellen auf, die später stärker verändert werden: sie sind nämlich nur in ± engbegrenzten Arealen anzutreffen.

Im Palisaden- und Schwammparenchym ist erstes Anzeichen einer krankhaften Veränderung starke Färbbarkeit der Zellkerne. Kerndeformierung konnte dabei nie beobachtet werden. Allein durch die leuchtend rot gefärbten Kerne sind — besonders in den Flächenschnitten — die befallenen Zellkomplexe vom unveränderten, in allen Zellbestandteilen nur durch Lichtgrün tingierten Assimilationsparenchym deutlich abgrenzbar. Später werden Plasma und Chloroplasten ebenfalls zunehmend chromophil. Es ist schwer zu entscheiden, ob zunächst das Plasma oder die Chloroplasten geänderte Färbbarkeit aufweisen. Im Endstadium sind die Chloroplasten meist ± verklumpt doch meist noch als Zellbestandteile erkennbar; mit dem inzwischen ebenfalls tiefrot gefärbten Plasma bilden sie einen dicken Belag an den Zellwänden. Die Vakuolen k ö n n e n , aber müssen nicht gefärbt sein. Kugelige Einschlüsse können vorkommen, und zwar treten sie dann zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Veränderung auf.

Bei der Beschreibung der jugendlichen Blätter war Entwicklungshemmung als Symptom erwähnt worden. Dieses kleinzellige und besonders dicht gefügte Assimilationsparenchym findet man in alten Blättern an Stellen, die schon sehr stark verändert sind (Abb. 3 d). Im Assimilationsparenchym mit fortgeschrittenen Symptomen sind die Interzellularen (einschließlich Atemhöhlen) meist ± mit chromophilem Material erfüllt, was im Schwammparenchym besonders auffällt.

Wie bereits erwähnt, zeigen die vaskulären Gewebe erst nach Veränderung des angrenzenden Parenchyms Symptome. Sowie jedoch Degenerationserscheinungen im Leitgewebe auftreten, können sie sich hier — wahrscheinlich bedingt durch die Zellform — u. U. etwas rascher ausbreiten als im Parenchym. Bei Serienschnitten durch eine größere Stielnekrose kann man demnach am oberen und unteren Ende u. U. kranke Leitbündelzellen in durchaus normalem Parenchym finden.

Die Zellen der Leitbündelscheiden zeigen Veränderungen nach Art der Parenchymzellen: im Endstadium zeigen sie dunkel gefärbten plasmatischen Wandbelag, oder sie sind — in den meisten Fällen — restlos mit chromophilem Material erfüllt.

In den Phloemzellen können, aber müssen keineswegs, vor jeder anderen pathologischen Veränderung kugelige Einschlüsse auftreten, und zwar einer bis wenige je Zelle. Später werden ohne Bevorzugung eines bestimmten Phloemelementes die Zellen von ± granulärem oder homogenem Material erfüllt, das im Laufe der Zeit an Färbbarkeit zunimmt. Einschlußkörper und Zellkerne — soweit vorhanden — sind oft noch längere Zeit durch ihre besonders intensive Färbung zu erkennen. Im Endstadium allerdings sind in den Zellen keine Einzelheiten mehr unterscheidbar. Auch die Zellwände sind etwas verdickt und sehr stark chromophil. Im Phloem der Kontrollen kann der Zellinhalt älterer Siebröhren ebenfalls durch Safranin färbbar sein, doch ist hier die Färbung wesentlich schwächer als in ENV-infizierten Pflanzen. Außerdem treten in gesunden Pflanzen nie Einschlußkörper auf.

Die Phloemfaserzellen der Petiolenleitbündel verlieren (auch in den Kontrollen) relativ spät ihren parenchymatischen Charakter. Erst in voll erwachsenen Blättern setzt, von der Basis ausgehend, die sekundäre Wandverstärkung ein; die stark verholzten Phloemfaserzellen liegen dann als deutliche Faserkappe dem Phloem auf. Treten die Stielnekrosen sehr bald auf, so werden die Phloemfaserzellen genau wie die anderen parenchymatischen Zellen des Leitbündels verändert. Zeigt der Blattstiel erst spät Symptome, d. h. zu einer Zeit in welcher normalerweise die sekundäre Wandverstärkung der Phloemfasern einsetzt, so unterbleibt diese. Man kann die Unterdrückung der sekundären Wandverstärkung schon an Faserzellen beobachten, die nicht unmittelbar an Phloem- bzw. Parenchymnekrosen angrenzen, sondern nur nahe solchen Nekrosen liegen. Ausbleiben der sekundären Wandverstärkung kann daher bei den Phloemfaserzellen als erste sichtbare Veränderung gelten.

Im Xylem können mitunter ähnlich wie im Phloem vor jeglicher Veränderung normaler Zellbestandteile stark färbbare Einschlußkörper in den Holzparenchymzellen auftreten (Abb. 4 d). Sonst beobachtet man als erste Veränderung Anschwellen und Chromophilwerden der Zwischenlamellen, was besonders deutlich an den Tüpfelmembranen zu erkennen ist (Abb. 4 c, d). Später wird das Plasma in den Holzparenchymzellen zunehmend granulär und färbbar. In den Gefäßen findet man mitunter einen dünnen, stark färbbaren Belag, bevor das ganze Lumen durch homogenes, ± färbbares Material verstopft wird. Im Endstadium sind auch die sekundär verstärkten Zellwände der Tracheen stärker färbbar als in den Kontrollen. Werden jugendliche, noch plasmaführende Tracheen mit unverstärkten Zellwänden befallen, verändern sie sich nach Art der Holzparenchymzellen.

Die Xylemfaserzellen zeigen als erste Veränderung ebenfalls zunehmende Färbbarkeit der etwas verstärkten Zwischenlamellen. Die weiteren Veränderungen entsprechen denen der Holzparenchymzellen.

Die meristematischen Zellen in jungen Leitbündeln zeigen Symptome nach Art der Phloem- bzw. Xylemparenchymzellen. Es konnte nicht beobachtet werden, daß sie besonders frühzeitig oder umgekehrt erst in stark veränderten Leitbündeln betroffen werden.

Die Nekrose breitet sich quer durch die Leitbündel genau wie im Parenchym aus: Anschließend an krankhaft veränderte Zellen werden immer neue befallen ohne Rücksicht auf die Zellart. Im Unterschied zum Parenchym entstehen in den Leitbündeln jedoch keine neuen Nekroseherde.

Zusammenfassend können die Veränderungen im erwachsenen Blatt folgendermaßen charakterisiert werden:

Ausgesprochen primärer Natur sind Veränderungen im Parenchym der Blattstiele und nahe den größeren Blattadern, soweit sie mit eindeutig krankhaften Veränderungen einzelner Zellbestandteile beginnen. Als Sekundäreffekte treten im Parenchym Hypertrophie, irreguläre Teilungen und Absterben unveränderter Zellen auf.

Primärer Natur sind ebenfalls die Veränderungen in den Parenchymscheiden der kleineren Blattadern, möglicherweise zum Teil auch die in den Scheidenzellen größerer Blattleitbündel einschließlich Petiolenleitbündel.

Die vaskulären Gewebe einschließlich Phloem- und Xylemfaserzellen können nur im Zusammenhang mit Parenchymveränderungen Symptome zeigen.

Ähnlich findet man verändertes Assimilationsparenchym nur nahe ± befallenen Parenchymscheiden bzw. nahe den Parenchymnekrosen.

Sowohl im Parenchym als auch im Leit- und Assimilationsgewebe können unter Umständen vor jeglicher Veränderung normaler Zellbestandteile Einschlußkörper auftreten.

Die Primärsymptome können ohne Bevorzugung eines bestimmten Zellalters an jeder beliebigen Stelle des Blattes einsetzen.

4. Infloreszenzen

Als Ergänzung zu den Befunden in den Blättern wurden die Infloreszenzstiele mit in die Untersuchung einbezogen. Makroskopisch konnten erst nach Kenntnis der inneren Veränderungen schwache Symptome, und zwar nur an neuinfizierten Pflanzen gefunden werden: Die Stiele waren gelegentlich schwach verdickt und etwas bräunlich verfärbt. In der Regel sind die Blütenstände kranker Pflanzen nur etwas schwächer als die der Kontrollen. Die Früchte infizierter Pflanzen reifen voll aus, selbst wenn die Pflanze relativ starke Symptome zeigt. Der Blüten- bzw. Fruchtstand stirbt also im Gegensatz zum Blatt nicht vorzeitig ab.

Die Leitbündel der Infloreszenzstiele sind ringförmig angeordnet. Nach außen werden sie durch einen geschlossenen Phloemfaserring gegen das Parenchym abgegrenzt. Kleinere Gruppen von Faserzellen befinden sich zwischen den einzelnen Leitbündelsträngen und verbinden sie zu einem geschlossenen Ring. Die Faserzellen verholzen im Vergleich mit denen der Petiolen sehr frühzeitig. Außerhalb des Leitbündelringes führt das Parenchym Chloroplasten und ist in den subepidermalen Schichten ähnlich wie im Blattstiel als Assimilationsparenchym ausgebildet. Innerhalb des Leitbündelringes befindet sich ein dünnwandiges Parenchym.

Die im folgenden beschriebenen Veränderungen wurden an Infloreszenzen beobachtet, die zur Zeit des Primärschocks angelegt worden waren; zur Zeit der Beobachtung waren die Blütenstände am Abblühen.

Die primären Parenchymveränderungen treten nur außerhalb des Leitbündelringes auf. Sie verlaufen genau wie in den Blattstielen und können ebenfalls Veränderungen in den Leitbündeln nach sich ziehen.

Die vaskulären Gewebe zeigen allerdings nur dann Degenerationserscheinungen, wenn die Parenchymsymptome schon in sehr jungen Infloreszenzstielen auftreten, was z. B. während des Primärschocks der Fall ist. Nur dann bleiben die naheliegenden Phloemfaserzellen unverholzt, degenerieren und ebenso die anschließenden Phloem- und Xylemzellen, sowie unter Umständen sogar einige Markzellen. Parenchymatische Zonen im sonst verholzten Phloemfaserring findet man immer nur nahe größeren Parenchymnekrosen (Abb. 5 b) und kranke Phloem-, bzw. Xylemzellen wiederum nur im Anschluß oder in unmittelbarer Nähe parenchymatischer, ± degenerierter Phloemfaserzellen. Später einsetzende pathologische Veränderung im Parenchym bedingt weniger einen graduellen Unterschied in der sekundären Wandverstärkung, als vielmehr eine ± normale Verholzung in einem entsprechend geringeren Prozentsatz von Phloemfaserzellen (Abb. 5 a).

Die parenchymatischen Phloemfaserzellen sprechen sehr leicht mit Teilungen auf pathologische Veränderungen in der Umgebung an, ebenso die Zellen der Leitbündelscheide. Es entstehen mitunter ausgesprochene Teilungszonen. Auf Abbildung 5 b ist eine derartige Zone dargestellt: links im Bild sind einige bereits sehr stark degenerierte Zellen einer größeren Parenchymnekrose sichtbar. Diese Nekrose, die schon sehr bald entstanden sein muß

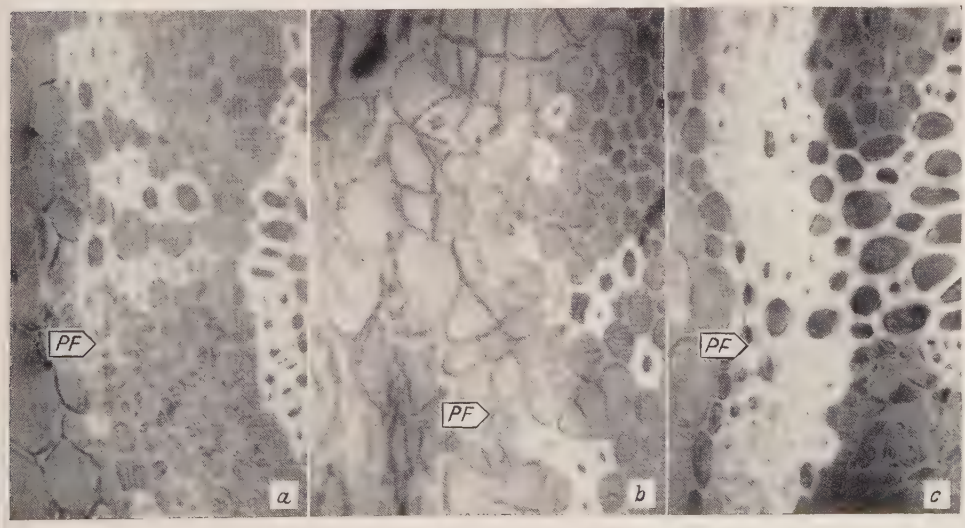


Abb. 5. Infloreszenzstiele (unfixiert) im Querschnitt: a, b ENV-infizierte Pflanzen, c Kontrolle. Der ± sichtbare Leitbündelring befindet sich jeweils rechts im Bild.
PF = Phloemfaserzellen

— an Größe und Stadium der Veränderungen kenntlich — ist für die Veränderungen im anschließenden Phloemfaserring verantwortlich.

An Stellen mit durchgehend verholztem Phloemfaserring kann man nur selten krankhaft verändertes Parenchym finden; es sind dann bestimmt nur wenige Zellen.

Es sei der Vollständigkeit wegen erwähnt, daß an Blütenstielen schon vor längerer Zeit erkrankter Pflanzen mit schwachen äußeren Symptomen keine inneren Veränderungen festgestellt werden konnten; an entsprechenden Pflanzen mit starken Symptomen konnten höchstens kleine Gruppen von kranken Parenchymzellen außerhalb des Phloemfaserringes beobachtet werden.

Typisch für die Veränderungen in den Infloreszenzstielen ist demnach:

Die Primärsymptome setzen grundsätzlich nur im Parenchym außerhalb des Leitbündelringes ein.

Die Veränderungen verlaufen genau wie in den Blattstielen, allerdings werden nicht unbegrenzt neue Zellen in die Nekrotisierung einbezogen. Abhängig vom Zeitpunkt des Auftretens der Primärsymptome bleiben die pathologischen Veränderungen auf ± kleine Areale begrenzt.

5. Sproß

Untersucht wurden jugendliche Sprosse einschließlich Sproßscheitel und ältere Sprosse, die zum Teil schon die Funktion eines Wurzelstockes übernommen hatten.

Durch Färbung mit Safranin und Lichtgrün erhält man nur bei jungen Sprossen gute Ergebnisse; bei älteren Sprossen werden auch in den Kontrollpflanzen alle Gewebe ± durch Safranin gefärbt. Im alten Sproß heben sich krankhaft veränderte Zellen in ENV-infizierten Pflanzen nur durch mehr gelbrote Tönung von der violettroten Farbe der unveränderten Zellen ab. Bei Untersuchungen am alten Sproß wurden daher meist hämatoxylingefärbte Schnitte (DELAFIELD) zum Vergleich herangezogen. In diesen Präparaten sind nur unverholzte und unveränderte Zellwände gefärbt, während bei kranken Zellen sowohl die Wände als auch der degenerierende Zellinhalt ungefärbt bleiben, d. h. schwach bräunlich erscheinen.

Voruntersuchungen an unfixierten Serienschnitten zeigten, daß zweierlei Nekrosen vorkommen können: 1. nahe den einmündenden Blattleitbündeln und 2. im Mark des Sprosses.

Die blattspurnahen Nekrosen erstrecken sich bis in das sproßumfassende Unterblatt: sie können als Fortsetzungen von Blattnekrosen aufgefaßt werden. Während jedoch in Blattspreite und -stiel im Laufe der Zeit immer größere Zellkomplexe befallen werden, konnte dieses Verhalten in der Sproßrinde nicht beobachtet werden. Die Nekrosen umfassen höchstens wenige Zellen des angrenzenden Leitbündelzylinders des Sprosses, meist enden sie in der Rinde. Oft werden sie durch Teilungszonen, deren Zellen unverändert erscheinen, gegen das übrige Rindenparenchym abgegrenzt. Die Zellen dieser

Nekrosen zeigen dieselben Veränderungen wie die der Blattnekrosen. Da keineswegs alle Stipeln an der Basis pathologische Veränderungen zeigen, treten die Rindennekrosen nur unregelmäßig auf. In seltenen Fällen kann durch sie eine ruhende Knospe in Mitleidenschaft gezogen und vernichtet werden.

Die Nekrosen im Mark haben keine räumliche Beziehung zu den Rindennekrosen. Genau wie diese dehnen sie sich nicht unbegrenzt aus. Auch im Mark wird durch wiederholte Teilungen in den umliegenden Zellen eine deutliche Abriegelung der Nekrose bedingt. Die Teilungszone zeigt — wenn überhaupt — nur anschließend an die Nekrose wenige krankhaft veränderte Zellen. Unmittelbar anschließende Gefäße können Veränderungen zeigen, wie sie bereits bei den Blättern beschrieben wurden.

In alten Sprossen konnten nie Zellveränderungen angetroffen werden, die als frühe Stadien einer Marknekrose angesehen werden konnten. Hingegen konnte in Längs- und Querschnitten durch die apikalen Sproßenden die Entstehung der Marknekrosen verfolgt werden. Die im folgenden beschriebenen Veränderungen wurden an neuinfizierten Pflanzen beobachtet, die gerade das erste symptomtragende Blatt entfaltet hatten.

Erste Veränderungen können im Mark ungefähr in der Zone zwischen Einmündung der Blattspur der dritten und der fünften Blattanlage auftreten. In den Blattspuren der fünften und vierten Blattanlage sind hier ein bis wenige Gefäße bereits vollständig ausdifferenziert, d. h. sie zeigen sekundäre Wandverstärkung und besitzen keinen plasmatischen Inhalt mehr. Außerhalb der Blattspuren ist das Leitgewebe des Sprosses noch weitgehend procambial. Die Markzellen zeigen in dieser Zone nur noch selten Teilungen, dafür beträchtliche Größenzunahme durch Ausbilden der zentralen Vakuole. Es ist dies ferner jener Sproßteil, in dem — auch in gesunden Pflanzen — die Affinität sowohl der Zellkerne, als auch des Plasmas und der Zellwände zu Safranin zunimmt. Jüngere, relativ plasmareiche Zellen werden in allen Bestandteilen nur durch Lichtgrün gefärbt; ältere Zellen mit großen Vakuolen zeigen Plasma und Zellwand blaßrot gefärbt und kräftig rot gefärbten Zellkern.

In ENV-infizierten Pflanzen kann man in ± großen Arealen dieser Zone bei relativ jungen Zellen im grün tingierten Plasma zahlreiche stark rot gefärbte Einschlußkörper finden. Die Einschlüsse der Sproßmarkzellen sind im Gegensatz zu denen der Blätter kleiner als die Nukleolen und kommen in größerer Zahl pro Zelle vor (Abb. 6 a Mitte). In naheliegenden älteren Zellen sind diese Einschlüsse etwas größer (Abb. 6 a unten); durch ihre besonders kräftige Färbung können sie noch immer vom jetzt auch normalerweise rosa gefärbten Plasma unterschieden werden. Später nimmt allerdings in den betroffenen Zellen auch das Plasma stark an Färbbarkeit zu; schließlich sind Plasma, Einschlüsse und Zellkern gleichstark gelbrot tingiert und bilden einen ± einheitlichen Belag an der Zellwand, die ebenfalls stärker als bei unveränderten Zellen gefärbt wird. Damit ist das Endstadium der pathologischen Veränderung erreicht: Derartige Zellen findet man auch in den Marknekrosen der älteren Sproßteile.

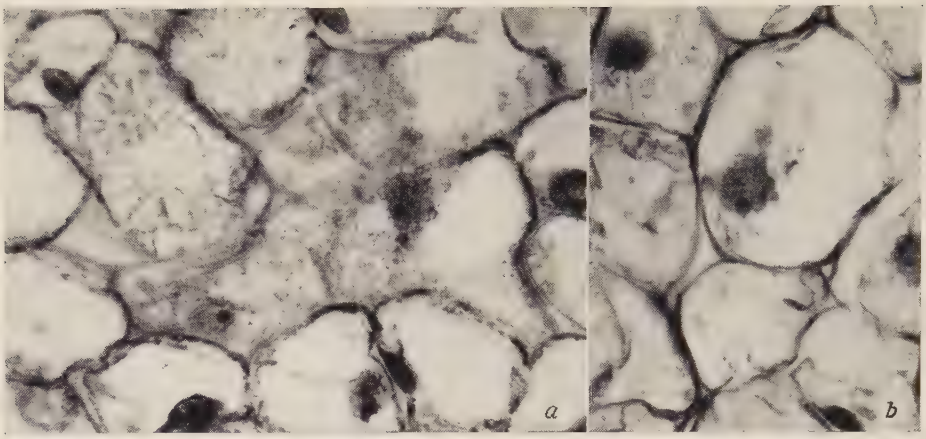


Abb. 6. Sproßquerschnitte: a Entstehung einer Marknekrose, b Kontrolle. (Näheres im Text)

Auf Grund der Beobachtungen wird für den Sproß als kennzeichnend angenommen:

Rindennekrosen stellen Fortsetzungen von Blattnekrosen dar. Sie können nicht für die Unterdrückung der Seitenkronenbildung verantwortlich gemacht werden.

Die Markzellen können nur in einem bestimmten Zellalter betroffen werden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Veränderungen nur zu Zeiten besonders starker Symptomausprägung, möglicherweise nur während des Primärschocks auftreten.

Sowohl Mark- als auch Rindennekrosen sind in ihrer räumlichen Ausdehnung auf relativ kleine Zellkomplexe beschränkt.

6. Vor dem Primärsymptomblatt entstandene Blätter

Es wurden Blätter aus den beiden bereits erwähnten, stark bzw. schwach reagierenden Neuinfektionsversuchen verwendet. Die Inokulationsblätter und die folgenden, noch keine Symptome zeigenden Blätter wurden in bestimmten Zeitabständen abgeschnitten, und zwar bis einschließlich des Zeitpunktes, an dem die Primärsymptome auftraten. Die Untersuchung erfolgte an fixiertem Material.

Bei Zeitintervallen von drei Tagen mußte das Inokulationsblatt mindestens neun Tage an der Pflanze bleiben, um eine Infektion zu garantieren. Die Inokulation durch den Vektor erfolgte auf unentfalteten Blättchen. Die Blätter zeigen während und unmittelbar nach dem Entfalten beachtliches Streckenwachstum; das Virus muß ungefähr 4 bis 6 cm durchwandern, um durch den Blattstiel in den Sproß zu gelangen.

Der Zustand der Blätter, die entwicklungsgeschichtlich älter als die Inokulationsblätter sind, wurde nur zur Zeit des Einsetzens der Primärsymptome untersucht.

In den Inokulationsblättern und in den, meist drei, Blättern, die sich vor dem Primärsymptomblatt entfalten, können mitunter schwache Abweichungen von den Kontrollen beobachtet werden. Die Blätter des stark reagierenden Versuches zeigen diese Symptome etwas deutlicher als die des schwach reagierenden. In den Leitbündeln der Blattstiele und in den Hauptadern der Blättchen kann unter Umständen das Phloem vorzeitig gealtert erscheinen: Der Siebröhreninhalt ist ähnlich blaßrot gefärbt wie in sehr alten Kontrollblättern. Es können aber auch ohne Bevorzugung der Siebröhren verschiedene Phloemzellen stark chromophiles Plasma zeigen. Kugelige Einschlüsse können in allen veränderten, aber auch in den sonst unverändert erscheinenden Zellen vorkommen.

In einem Fall waren außer den Phloemzellen auch ± vollständig die Xylemparenchym- und Xylemfaserzellen, die Leitbündelscheidenzellen und sehr selten einige unmittelbar an die Scheide anschließende Parenchymzellen krankhaft verändert: Plasma stark chromophil, mit ± zahlreichen kugeligen, ebenfalls stark färbbaren Einschlüssen. Diese Veränderungen wurden in den beiden letzten Vorprimärsymptomblättern einer stark reagierenden Pflanze beobachtet; die Blätter waren zur Zeit des Primärschocks abgeschnitten worden.

In allen erwähnten Fällen findet man die Symptome im Blattstiel oft nur in einem der beiden Seitenleitbündel und unter Umständen im naheliegenden Teil des Hauptleitbündels. Die Veränderungen können meist bis in die zugehörigen Blattadern verfolgt werden. Eine eindeutige Beziehung zwischen Symptomstärke und der Zeit, die seit der Infektion verflossen war, konnte — mit Ausnahme des erwähnten Falles — nicht festgestellt werden; möglicherweise war dafür das untersuchte Material nicht umfangreich genug.

In den im Vergleich zum Inokulationsblatt älteren Blättern konnten keine inneren Veränderungen gefunden werden.

Die für ENV-Infektion typischen zytologischen und anatomischen Veränderungen, besonders im extravaskulären Gewebe, können demnach nur entstehen, wenn sehr jugendliche Gewebe infiziert werden. Die Frage, ob ältere extravaskuläre Gewebe resistent gegen Infektion sind, oder ob sie lediglich anders als im juvenilen Zustand befallene auf die Infektion ansprechen, muß vorläufig unbeantwortet bleiben.

Charakterisierung des ENV auf Grund der pathologisch-anatomischen Veränderungen in der Wirtspflanze

Unter Berücksichtigung der Entwicklungsgeschichte sämtlicher innerer Veränderungen nach Neuinfektion und nach stattgefundener systemischer Infektion kann das ENV folgendermaßen charakterisiert werden:

Das ENV wirkt hauptsächlich verändernd auf Gewebe, die vermittelnd zwischen Assimilationsparenchym und Leitgeweben stehen, d. h. es wird vor allem Reaktionen beeinflussen, die den Transport der Assimilate in diesen Geweben betreffen. Diese Veränderungen sind ausgesprochen primärer Natur

und ziehen in der Regel Veränderungen in den Leitgeweben und im Assimilationsparenchym nach sich. Typisch für den Veränderungszyklus ist das Verhalten der Blätter ab Primärsymptomblatt. Durch diese Reaktionen wird der äußere Krankheitsverlauf bedingt.

Unabhängig von diesen Symptomen können in den Leitbündelscheiden bestimmter Blattanlagen (Seitenachsen) — möglicherweise auch in denen entfalteter Blätter — und im Mark des Sprosses andere primäre Veränderungen auftreten, letztere aller Wahrscheinlichkeit nach nur unter bestimmten Voraussetzungen (Primärschock). In beiden Fällen treten die Symptome äußerlich nie in Erscheinung. Sie haben keinen merklichen Einfluß auf den Krankheitsverlauf.

Primäre Veränderungen in den Leitbündeln treten grundsätzlich nur nach Neuinfektion in den Vorprimärsymptomblättern auf. Sie sind ohne Bedeutung für die äußere Symptomatik und den Krankheitsverlauf.

Die sowohl bei allen primären als auch Folgeveränderungen auftretenden Einschlußkörper sind wahrscheinlich als erste Anzeichen des gestörten Stoffwechsels und nicht als Einschlüsse nach Art der X-Körper zu werten.

Die äußere Symptommanifestierung in Abhängigkeit von den anatomischen Veränderungen und den Umweltbedingungen

Veränderungen im Parenchym zwischen Assimilations- und Leitgewebe sind gemäß der Charakterisierung des ENV die für den Krankheitsverlauf entscheidenden Symptome.

Diese Parenchymsymptome treten bei schwacher äußerer Krankheitsmanifestierung in relativ alten Blättern auf und es werden nur kleine Zellgruppen in die Veränderung einbezogen. Schwache bzw. keine äußeren Symptome findet man bei tiefen Temperaturen und Kurztag, d. h. bei langsam wachsenden Pflanzen, oder aber bei stark wüchsigen Pflanzen (Sommer), die reichlich mit Nährstoffen aus dem Boden versorgt werden (nach Kunstdüngergaben oder Umtopfen).

Dementsprechend bedingt neben hohen Temperaturen und Langtag auch mangelhafte Versorgung mit Mineralstoffen starke äußere Krankheitsmanifestierung. Unter diesen Bedingungen treten die Parenchymnekrosen relativ frühzeitig auf; auch hier erleiden zunächst nur kleinere Zellgruppen Veränderungen, doch dehnt sich die spätere Nekrose bald nach allen Seiten hin aus, einzelne Herde verschmelzen, die Leitbündel werden befallen und die Blätter müssen vorzeitig absterben. Die Pflanze ist also blattarm und erscheint schon deshalb schwächer als gleichalte Kontrollpflanzen. Außerdem zeigt sie infolge mangelhafter Versorgung mit Assimilaten tatsächlich etwas zögernden Wuchs. Die Schwachwüchsigkeit muß also als ein abgeleitetes, umweltbedingtes Symptom angesehen werden.

Die meist fehlende Seitenkronenbildung kann ebenfalls nicht direkt auf virusinduzierte Veränderungen in den Seitenkronenanlagen zurückgeführt werden. Wohl sind hier die Symptome in den Blattanlagen —

besonders in ruhenden Knospen — stärker als in der Terminalknospe, doch zeigen Ausläuferanlagen diese Veränderungen noch viel ausgeprägter und kommen trotzdem zur Entwicklung. Dieses unterschiedliche Verhalten kann durch die völlig anders gearteten Bedingungen für die Ausläuferbildung einerseits und die Seitenkronenentstehung andererseits erklärt werden: Ausläufer entwickeln sich in Abhängigkeit von hoher Temperatur und Langtag, während Seitenkronenbildung durch Pflanzengröße und Wüchsigkeit gegeben ist (Smeets und Kronenberg 1955, Guttridge 1955).

Da ENV-kranke Pflanzen gerade dann, wenn gute Wachstumsbedingungen gegeben sind, in der Regel starke Symptome zeigen (Ausnahme starke Düngung), sind sie in dieser Zeit besonders schwachwüchsig und die in normaler Zahl angelegten Seitenkronen werden nicht auswachsen. Wie stark die Seitenkronenanlagen durch die Infektion in ihrer Versorgung mit Nährstoffen beeinträchtigt werden, zeigt ein Größenvergleich zwischen verschieden alten Anlagen einer gesunden und einer kranken Pflanze (Tab. 1). Bei der gesunden Pflanze ist die Achselknospe des ersten entfalteten Blattes 3,0 mm lang, die des achten Blattes 10,0 mm, d. h. sie wächst innerhalb von sieben Plastochronen um 7,0 mm. Dagegen ist die Achselknospe des ersten entfalteten Blattes der kranken Pflanze nur 1,5 mm groß und nimmt innerhalb von sieben Plastochronen nur um 1,0 mm zu; sie erreicht also nur mehr ein Viertel der Länge (2,5 mm) einer gesunden Achselknospe. Während der rund vier Plastochrone, die von der Anlage der Seitenkrone bis zum Entfalten des zugehörigen Tragblattes vergehen, hatte sie immerhin noch die halbe Größe der gesunden Knospe erreicht.

Tabelle 1

Größenvergleich zwischen Achselknospen (Seitenkronenanlagen) einer gesunden und einer ENV-infizierten Pflanze

Größe der ruhenden Knospe in mm		Zugehöriges Blatt
gesunde Pflanze	kranke Pflanze	
3,0 mm	1,5 mm	1. entfaltetes Blatt
4,5 mm	1,5 mm	2. entfaltetes Blatt
4,5 mm	2,0 mm	3. entfaltetes Blatt
+++	2,5 mm	4. entfaltetes Blatt
5,5 mm	+++	5. entfaltetes Blatt
Ausläufer	Ausläufer	6. entfaltetes Blatt
Ausläufer	Ausläufer	7. entfaltetes Blatt
10,0 mm	2,5 mm	8. entfaltetes Blatt*

+++ = abgestorbene Achselknospe;
* = das achte Blatt der kranken Pflanze war bereits abgefallen.

Auch die Totalnekrose, die man mitunter bei ENV-Infektion im Primärschock beobachten kann, muß als abgeleitetes, umweltbedingtes Symptom angesehen werden. Selbst in besonders stark reagierenden Neuinfektionen kann man die für den Krankheitsverlauf entscheidenden Parenchymsymptome frühestens in sich eben entfaltenden Primärsymptomblättern finden.

Wenn man von neuinfizierten Pflanzen mit ein bis zwei symptomtragenden Blättern sämtliche — also auch die symptomlosen — Blätter abschneidet, so entfalten sie frühzeitig das folgende, unter Umständen auch noch das zweitfolgende Blatt. Diese Blätter reagieren an sich noch sehr stark (Primärschock). Durch das vorzeitige Entfalten nehmen sie in sehr jugendlichem Stadium die Assimilation auf, die Parenchymsymptome setzen sehr stark und sehr bald ein; die Leitgewebe werden entsprechend frühzeitig in die Nekrotisierung einbezogen, und die Blätter sterben ab, lange bevor sie ihre endgültige Größe erreicht haben. Die folgenden Blattanlagen haben inzwischen noch nicht die Mindestgröße erreicht, die für den Beginn des Streckenwachstums (Entfalten) erforderlich ist. Es kann sich in sehr seltenen Fällen noch ein kleines, kurzstieliges Blatt entfalten, das genau so schnell abstirbt wie die vorhergegangenen, doch dann stellt die Pflanze ihren Wuchs ein und geht zugrunde. Ohne besondere Behandlung der Versuchspflanze tritt Totalnekrose nur ein, wenn man sehr junge Ausläuferpflanzen mit nur wenigen und kleinen Blättern infiziert und die Umweltbedingungen ausgesprochen symptomfördernd sind.

Mit der Annahme, daß die wichtigsten inneren Veränderungen in Korrelation zur Assimilation, bzw. zum Transport der Assimilate stehen, ist das Verhalten der Infloreszenzen gut in Einklang zu bringen.

Hier tritt die Nekrotisierung größerer Zellkomplexe nur zur Zeit sehr starker Reaktionsfähigkeit (Primärschock) ein und nur im Parenchym zwischen subepidermalen Zellschichten und Leitbündelzylinder. Im Gegensatz zu den Blättern bleiben die Nekrosen räumlich beschränkt, d. h. die Nekrose wird nicht mit zunehmendem Alter der Infloreszenz größer.

Die subepidermalen Zellschichten sind wie erwähnt als Assimilationsparenchym ausgebildet und der Phloemfaserring ist in sehr jungen Infloreszenzstielen unverholzt. Abwanderung der Assimilate in die Leitbündel ist demnach möglich. Mit der sehr früh einsetzenden Verholzung des Phloemfaserringes wird dieser Weg unterbunden. Man kann dementsprechend die Entstehung größerer Nekrosen nur im extravaskulären Parenchym junger Infloreszenzstiele erwarten. In älteren Stielen findet man dann diese Nekrosen immer nur nahe unverholzten Faserzellen, die meist wie die unmittelbar anschließenden vaskulären Gewebe ± krankhaft verändert sind.

In den jungen Infloreszenzstielen werden also genau wie in den Blattstielen zunächst immer neue Parenchymzellen in die Nekrotisierung einbezogen, unter Umständen auch anschließende Zellen des Leitbündelzylinders. Inzwischen verholzt der nicht betroffene Phloemfaserring. Durch die nekrotischen Parenchymzellen wird nun der unverholzte, sozusagen noch offene Teil des Faserringes gegen das unveränderte Parenchym abgeriegelt, bzw. ist der Faserring hier schon selbst nekrotisch geworden und außer Funktion gesetzt: Die Nekrose ersetzt gewissermaßen selbst den unverholzten Phloemfaserring. Der Transport der Assimilate ist damit restlos unterbunden. Später zeigen nur in seltenen Fällen einzelne Parenchymzellen krankhafte Veränderungen. Die Infloreszenz bzw. der Fruchtstand kann normal ausreifen.

Daß der Sproß trotz gelegentlicher Rindennekrosen nie in dem Maße wie die Blätter angegriffen wird, kann auf ganz ähnliche Weise erklärt werden.

Das Unterblatt sitzt mit breiter Basis dem Sproß auf. bzw. geht in das Rindengewebe des Sprosses über. Es besitzt genau wie die Blatt- und Blütenstiele chloroplastenführende, subepidermale Zellschichten; folglich können hier im Parenchym Veränderungen auftreten. Die Sproßrinde wird nur mehr aus nicht assimilierenden Zellen aufgebaut, daher können sich in ihr die Nekrosen des Unterblattes nicht weiter ausbreiten und es können in ihr keine neuen, infektionsbedingten Nekroseherde entstehen. In älteren Sprossen zeigt die Rinde lediglich normale Alterung und Altersnekrosen.

Die übrigen durch das ENV primär induzierten Veränderungen (Leitbündelscheiden, Leitbündel, Markparenchym des Sprosses) sind, wie aus den entsprechenden Beobachtungen hervorgeht, ohne sichtlichen Einfluß auf die äußere Symptomausprägung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine ganze Anzahl verschiedener äußerer Symptome wie Maskierung, vorzeitiges Absterben der Blätter, schwacher Wuchs, Ausfall von Seitenkronen und Totalnekrose auf ursprünglich einheitliche anatomische Veränderungen zurückzuführen ist.

Zusammenfassung

In einer entwicklungsgeschichtlich-anatomischen Untersuchung werden die pathologischen Veränderungen in ENV-infiziertes *Fragaria vesca*/Klon East Malling beschrieben.

In den Sproßvegetationspunkten treten nur in Blattanlagen, deren Leitbündel bereits die ersten Xylemelemente weitgehend ausdifferenziert haben, virusspezifische Symptome auf, und zwar in den Leitbündelscheiden des Unterblattes.

Die für ENV-Infektion besonders typischen und wichtigen Primärsymptome im Parenchym können frühestens im eben entfalteten Blatt beobachtet werden. Diese für den Krankheitsverlauf maßgebenden Veränderungen können auch in älteren Blättern neu einsetzen.

Ebenfalls als primäre Veränderungen müssen die in den Parenchymscheiden der kleinen Blattadern und wahrscheinlich zum Teil auch die in den Leitbündelscheiden der großen Blattadern einschließlich Petiolenleitbündel angesehen werden.

Vaskuläre Gewebe können in der Regel nur in Abhängigkeit von den Veränderungen im Parenchym Symptome zeigen.

In den Infloreszenzstielen entspricht der Verlauf der pathologischen Veränderungen weitgehend dem in den Blattstielen. Allerdings setzen hier die Parenchymsymptome nur zwischen Epidermis und Leitbündelscheide ein und bleiben auf ± kleine Zellkomplexe beschränkt. Die Größe der veränderten Gewebepartien steht in Beziehung zum Entwicklungszustand der Infloreszenz zum Zeitpunkt des ersten Auftretens der Parenchymsymptome.

Im Sproß können zweierlei Veränderungen auftreten: Als Fortsetzung der Symptome des Unterblattes Rindennekrosen und unabhängig davon Marknekrosen. Beide Arten von Nekrosen dehnen sich nicht unbegrenzt aus. Die Marknekrosen entstehen wahrscheinlich nur zur Zeit des Primärschocks.

Im Inokulationsblatt und in den symptomlosen Blättern, die sich nach der Inokulation entfalten, findet man in der Regel Veränderungen nur in den vaskulären Geweben, in seltenen Fällen auch in den Leitbündelscheiden und in einigen unmittelbar an die Scheiden angrenzenden Parenchymzellen (Blattstiel).

Auf Grund der anatomischen Veränderungen in der Wirtspflanze *Fragaria vesca*, L. wird das ENV als ein Virus charakterisiert, das primär hauptsächlich auf Gewebe wirkt, die vermittelnd zwischen Assimilations- und Leitgewebe stehen. Die gleichfalls primären Veränderungen in den Leitbündelscheiden und im Mark des Sprosses sind auf den Krankheitsverlauf ohne merklichen Einfluß.

Abschließend wird die äußere Symptommanifestierung in ihrer Abhängigkeit von den inneren Veränderungen und den Umweltbedingungen dargestellt. Schwachwüchsigkeit, Unterdrückung der Seitenkronen und Totalnekrose sind als abgeleitete, umweltbedingte Merkmale aufzufassen.

Summary

Anatomical and developmental investigations on *Fragaria vesca* L. infected with necrotic virus

The anatomic effects of the strawberry necrosis virus (ENV) on *Fragaria vesca* clone East Malling are described in a developmental study.

In the growing points of shoots symptoms specific to ENV appear only in leaf primordia in which the first xylem elements are well differentiated into vessels, namely in the bundle sheath cells of stipules.

The most important and typical symptoms of ENV infection are first detected in the parenchyma of leaves just unfolded. The externally visible symptoms result from these changes, which may begin in older leaves too. Other symptoms that must be regarded as primary changes occur in the parenchyma sheath of small leaf veins and probably to a certain extent also in the bundle sheath of large veins of leaves including the bundle sheath of petioles.

Vascular tissues usually show symptoms only in connection with parenchyma-symptoms.

In peduncles the pathologic effects are very similar to those of petioles. The symptoms, however, begin only in parenchyma between epidermis and bundle sheath and are confined to more or less small groups of cells. The extension of tissues affected is in correlation to developmental stage of inflorescence at the time of first appearance of parenchyma-symptoms.

In the shoot two kinds of changes may occur: Necrosis in the cortex continuing the symptoms of stipules, and necrosis in the pith. Both do not spread indefinitely. Pith necrosis probably occurs only in the primary shock.

In the inoculated leaves and in the symptomless leaves that develop after inoculation, changes generally are observed only in vascular tissues and rarely in bundle sheaths or some parenchyma cells immediately adjacent to them (petiole).

On the basis of anatomical changes of host plant *Fragaria vesca* strawberry necrosis virus is characterized as a virus producing primary symptoms mainly in tissues between assimilating and conducting tissues. Primary changes occurring in bundle sheaths and pith of shoots are without detectable influence on the externally visible development of the disease.

Finally the external manifestation of symptoms as affected by internal changes and environmental conditions is discribed. Poor growth, repression of side shoots and total necrosis are to be regarded as derived characters conditioned by environment.

Literaturverzeichnis

Arney, S. E., 1953: The initiation, growth and emergence of leaf primordia in *Fragaria*. Ann. Bot. **17**, 477—492.

— —, 1953: Studies in the growth and development in the genus *Fragaria*. I. Factors affecting the rate of leaf production in Royal Sovereign strawberry. J. Hort. Sci. **28**, 73—84.

Guttridge, C. G., 1955: Observations on the shoot growth of the cultivated strawberry plant. J. Hort. Sci. **33**, 1—11.

Johansen, D. A., 1940: Plant Microtechnique. 1st ed., McGraw-Hill Book Comp., Inc. New York and London.

Schöniger, G., 1958: Erdbeervirosen in Deutschland. III. Das Erdbeernekrosevirus, ein weiteres nicht persistentes Virus. Phytopath. Z. **32**, 325—334.

Smeets, L., and H. G. Kronenberg, 1955: Runner formation on strawberry plants in autumn and winter. Euphytica **4**, 53—57.

Sylvester, E. S., 1956: Beet mosaic and beet yellows virus transmission by the green peach aphid. J. Amer. Soc. Sugar Beet Technol. **9**, 56—61.

Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich

Weitere Untersuchungen über die chemischen Abwehrreaktionen der Orchideen[1])

Von

E. Gäumann, J. Nüesch und R. H. Rimpau

Mit 7 Abbildungen

Inhalt: 1. Kapitel. Die Arbeitsmethoden. — 2. Kapitel. Verbreitung und chemische Grundlagen der Infektabwehr bei den Orchideen. — 3. Kapitel. Das Spektrum der antigenen Mikroorganismen. — 4. Kapitel. Das Wirkungsspektrum des Orchinols. — 5. Kapitel. Allgemeine Betrachtungen. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

In zwei früheren Mitteilungen (Gäumann und Kern 1959 b, Gäumann und Hohl 1960) haben wir über chemische antiinfektionelle Abwehrreaktionen der Orchideen berichtet, die zur Synthese des Abwehrstoffes Orchinol führen. In der vorliegenden Arbeit möchten wir an Hand von neuem Knollenmaterial einige unserer früheren Angaben ergänzen und vertiefen; in ihrem Mittelpunkt stehen zwei Fragen:

a) Bei welchen Reaktionspaaren (Orchideenknollen versus Pilze oder Bakterien) werden in den Knollengeweben chemische Abwehrreaktionen induziert? Und

b) bei welchen Reaktionspaaren führen diese Abwehrreaktionen zur Synthese von Orchinol?

1. KAPITEL. DIE ARBEITSMETHODEN

Wir möchten zunächst die Arbeitsmethoden eingehend schildern, damit die Versuche jederzeit reproduziert werden können.

§ 1. Die allgemeine Prüfung der Knollengewebe auf den Reaktionserfolg

Eine antiinfektionelle Abwehrreaktion einer Orchideenknolle auf einen heranwachsenden Mikroorganismus liegt dann vor, wenn das Knollenfrag-

[1]) Die vorliegende Arbeit wurde durch den schweizerischen Nationalfonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung unterstützt; wir möchten den zuständigen Behörden auch hier unseren Dank wiederholen.

ment den heranwachsenden Mikroorganismus aufhält und auf der Agarplatte um sich herum einen Hemmhof (Abb. 1) entstehen läßt.

Unsere Methode für die Ausbildung von Hemmhöfen entspricht im wesentlichen der von GÄUMANN, BRAUN und BAZZIGHER (1950) beschriebenen: In Petrischalen wurde eine etwa 5 mm dicke Schicht von 2%igem Malzagar gegossen und mit einem der zu prüfenden Pilze beimpft. Nach sechs Tagen (bei langsam wachsenden Pilzen auch später) wurden mit einer sterilen Rasierklinge etwa 3 cm lange und 0,5 cm breite Myzelstreifen samt dem darunterliegenden Agar herausgeschnitten und mit dem Pilz nach unten in frischgegossene Petri- oder Esmarchschalen gelegt. Wenn dort das Myzel wieder genügend erstarkt war und eine saubere Wuchsfront gebildet hatte, wurde ein steriles, mindestens 1 cm^3 großes Knollenstück von *Orchis militaris* etwa 3 bis 15 mm (je nach der Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes) vor die Myzelfront gelegt. Die Inkubationstemperatur betrug in der Regel 25 °C. Es wurden mindestens drei Parallelen angesetzt. Die Ablesung erfolgte meist nach drei bis fünf Tagen. Die Versuche wurden von unserer Mitarbeiterin Frl. Frida SPECKERT durchgeführt.

Je nach der Intensität der Reizantwort lassen sich drei Stufen unterscheiden.

Im optimalen Falle wird der gegen das Knollenfragment hin wachsende Pilz in einigem Abstand vor dem Fragment angehalten, wodurch das schon besprochene Bild eines Hemmhofes entsteht; ein schmaler, aber ausgeprägter Hemmhof ist für die Kombination *Rhizoctonia mucoroides* von *Vanda suavis* mit einem Knollenfragment von *Orchis militaris* in Abb. 1

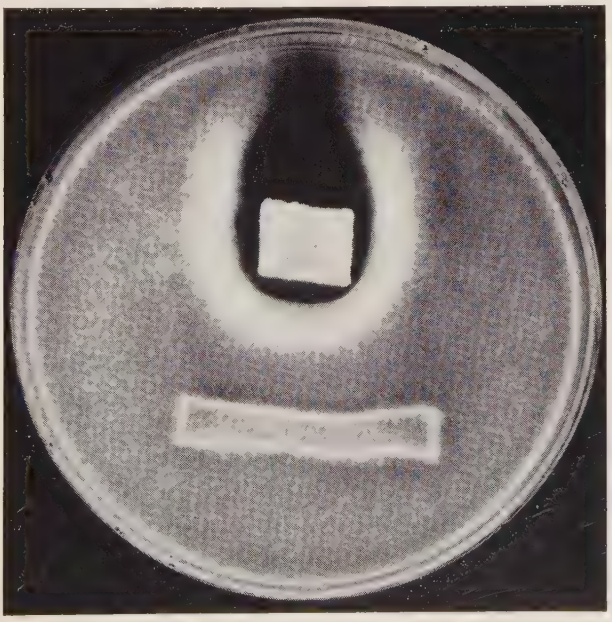


Abb. 1. Schmaler, jedoch ausgeprägter Hemmhof mit Aufstauung der Myzelfront bei der Kombination *Rhizoctonia mucoroides* von *Vanda suavis* mit einem Knollenfragment von *Orchis militaris*. 3/4 nat. Gr. Orig. Phot. Inst. E.T.H.

wiedergegeben, ein anderes Beispiel (*Rhizoctonia repens* von *Orchis militaris* mit einem Knollenfragment von *Orchis militaris*) bei GÄUMANN 1951, Abb. 318. Diese optimalen Hemmerfolge wurden jeweils in den Tabellen mit einem + eingetragen.

In anderen Fällen kommt es zwar nicht zur Ausbildung eines typischen Hemmhofes; dennoch geht vom Knollenfragment eine gewisse Hemmwirkung

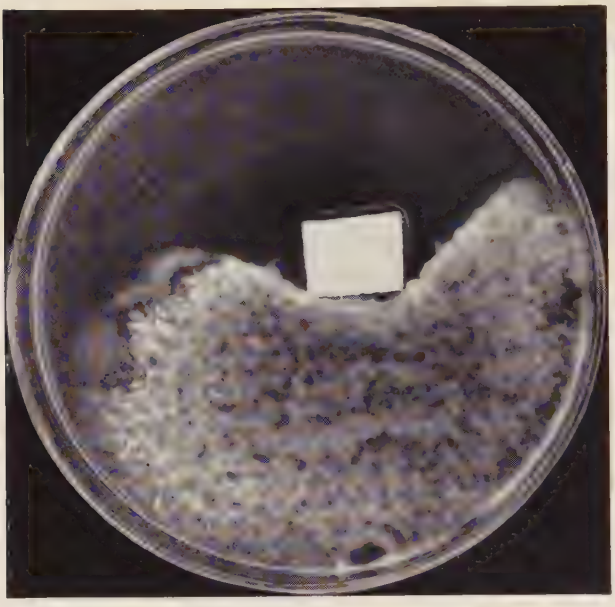


Abb. 2. Vom Knollenfragment geht eine schwache Hemmwirkung aus, so daß der heranwachsende Pilz (im vorliegenden Falle *Rhizoctonia versicolor* von *Loroglossum hircinum*) das Knollenfragment (im vorliegenden Falle *Orchis militaris*) nicht zu besiedeln vermag, sondern in seiner unmittelbaren Nähe das Wachstum einstellt.
3/4 nat. Gr. Orig. Phot. Inst. E.T.H.

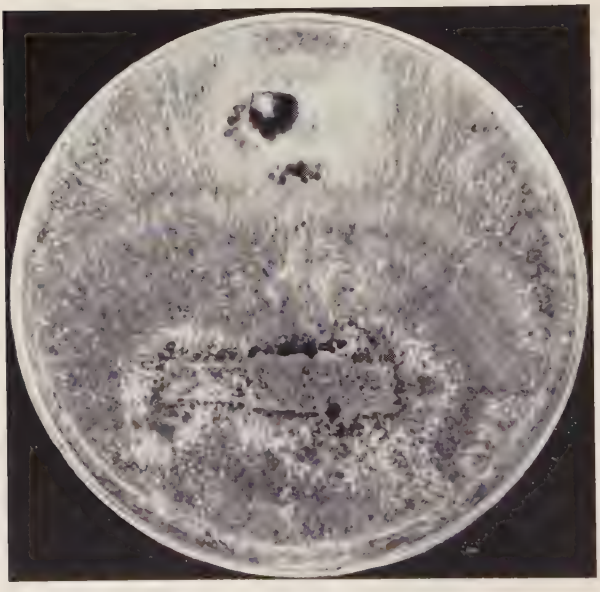


Abb. 3. Fehlen jeglicher Hemmwirkung bei der Kombination *Rhizoctonia solani*, Stamm RS 6 von *Solanum tuberosum*, mit einem Knollenfragment von *Orchis militaris*.
3/4 nat. Gr. Orig. Phot. Inst. E.T.H.

aus, so daß der heranwachsende Pilz das Fragment nicht zu besiedeln vermag, sondern in seiner unmittelbaren Nähe das Wachstum einstellt (Abb. 2). Diese intermediären Fälle wurden jeweils in den Tabellen mit einem ± bezeichnet.

Im extrem negativen Falle nimmt der vorgesetzte Pilz vom Knollenfragment überhaupt keine Notiz: er überwächst es und benützt es zuweilen sogar als Nährstoffquelle (Abb. 3). Dieses Fehlen jeglicher Hemmwirkung ist in den Tabellen mit 0 angedeutet.

§ 2. Die Prüfung der Knollengewebe auf das Vorhandensein von Orchinol

Zur Beantwortung der Frage, ob die beobachteten Hemmhöfe auf die Bildung von Orchinol oder auf einen anderen Hemmstoff zurückgehen, hätten wir die von den Agarplatten stammenden Knollenfragmente unmittelbar auf Orchinol aufarbeiten können. Zweckmäßiger war es, hierfür eine zweite, parallele Versuchsserie in einer Nährlösung anzusetzen.

In 100 ml Erlenmeyerkölbchen mit 5 bzw. 10 ml Hellerscher Nährlösung wurde eine Sporen- oder Myzelfragmentsuspension aus einer Reiskultur pipettiert. Nach zwei bis sieben Tagen war der Mikroorganismus herangewachsen und hatte seine Induktionsstoffe (Antigene) zu bilden begonnen; in jeden Kolben wurde deshalb eine aseptisch gewonnene Gewebewalze der zu prüfenden Orchidee gegeben und sechs bis zehn Tage auf der Wippmaschine bei 27 °C inkubiert. Hernach wurden die Knollengewebe (unter Zusammenfassung der fünf Parallelen) aufgearbeitet und papierchromatographisch auf ihren Orchinolgehalt geprüft (Gäumann und Kern 1959 a).

§ 3. Die Desinfektions- und Kontrollmethoden

Die Klippen unserer so einfachen Arbeitsmethode liegen in der Wahl des Desinfektionsmittels für die intakten Knollen und hernach in der Kontrolle der Knollengewebe auf Keimfreiheit.

Zunächst erwies sich im Laufe der Zeit, daß schon die Art der Desinfektion der intakten Knollen ihre Fähigkeit, später unter der Einwirkung eines antigenen Pilzes Orchinol zu synthetisieren, entscheidend verändert. Diese Empfindlichkeit der Knollen auf Chemikalien hängt möglicherweise mit dem Umstande zusammen, daß sie keine eigentliche Rinde besitzen und daß infolgedessen das Desinfiziens unmittelbar auf die Knollengewebe selbst einwirkt. Es galt deshalb, eine möglichst schonende und dennoch möglichst zuverlässige Desinfektionsmethode zu finden. Vom Standpunkte des schonenden Vorgehens wäre eine fünfminutige Desinfektion der Knollen mit einer 1‰-wässerigen Sublimatlösung am günstigsten gewesen; denn sie schädigt in den Knollengeweben die Fähigkeit zur späteren Orchinolsynthese nur geringfügig. Wir haben deshalb in früheren Jahren, als die Produktion möglichst großer Mengen von Orchinol im Vordergrund stand, die Knollen von *Orchis militaris* nur mit Sublimat desinfiziert.

Leider ist die Tiefenwirkung einer wässerigen Sublimatlösung gering; sie vermag erdbewohnende Bakterien wie *Erwinia carnegieana* Lightle et al., *Erwinia nimipressuralis* Carter und *Pseudomonas putida* (Trev.) Mig., die

z. B. bei *Orchis militaris* und bei *Loroglossum hircinum* häufig in den peripheren Knollenschichten vorkommen, nicht zuverlässig zu eliminieren. Anderseits gelingt dies ohne weiteres durch eine genügend lange Desinfektion mit Propylenoxyd; dieses schädigt jedoch bei längerer Einwirkung die Knollengewebe und vermindert insbesondere ihre Fähigkeit zur späteren Synthese von Orchinol. Als Kompromiß wählten wir schließlich bei den hier zu besprechenden Versuchen eine fünfminutige Sublimatbehandlung mit anschließendem Spülen und leichtem Abtrocknen und hernach einer einstündigen Behandlung mit Propylenoxyd.

Doch ist der Desinfektionserfolg dieser Kompromißmethode nicht immer zuverlässig. Bei den Hemmhofversuchen entsteht dadurch kein großer Schaden; denn die in den Knollenfragmenten eventuell zurückgebliebenen klandestinen Kontaminationen wachsen normalerweise auf den Agar hinaus und geben sich dadurch als solche zu erkennen.

Bei den Nährlösungsversuchen mit Gewebewalzen mischen sich dagegen die ins Freie wuchernden gewebeeigenen Kontaminationen klandestin mit den eingeimpften Pilzmyzelien oder Bakteriensuspensionen und entziehen sich dadurch der Kontrolle; und nun sind als Tücke des Objektes gerade einige dieser häufig in den peripheren Knollenschichten vorkommenden Bakterienarten als einzige bis jetzt bekannte saprophytische Mikroorganismen (Tab. 5 und 6) imstande, in den Knollengeweben z. B. von *Orchis militaris* die Synthese von Orchinol auszulösen.

Dadurch wird die Prüfung der Gewebewalzen auf Keimfreiheit zur eigentlichen Schicksalsfrage. Wenn nämlich im Innern der Gewebe oder der Gefäßbündel eine inapparente Kontamination durch eine dieser Bakterien zurückbleibt, so kann sie sich bei der hohen Versuchstemperatur entwickeln und in ihrer Nachbarschaft die Bildung von Orchinol induzieren. Die Gewebewalzen enthalten dann Spuren von versuchsfremdem Orchinol, die sich makrochemisch als solche nicht erfassen lassen, hingegen durch den sensiblen papierchromatographischen Orchinolnachweis (Bruchteile von Gamma) erkannt und dann fälschlicherweise dem geprüften Mikroorganismus zugeschrieben werden.

Zu Beginn unserer Versuche führten wir die Kontrolle auf Kontaminationsfreiheit in der Weise durch, daß wir die ausgestochenen Gewebewalzen zunächst drei Tage in Kölbchen mit HELLERscher Nährlösung legten (27 °C). Wenn die Kölbchen sauber blieben, hielten wir die Gewebewalzen für keimfrei und verwendeten sie für die eigentlichen Induktionsreihen. Im Verlaufe der Zeit erwies sich leider diese Methode als ungenügend; denn die drei „kritischen" Bakterien wachsen (vielleicht wegen des pH von rund 5,1) nur zögernd in die HELLERsche Nährlösung hinaus. Es konnte deshalb geschehen, daß sich tiefgelagerte Herde unserer Beobachtung entzogen und dann beim geprüften Mikroorganismus die Induktion von Orchinol vortäuschten; so haben wir in einer früheren Arbeit (GÄUMANN und KERN 1959 b, S. 16) auf Grund von Tastversuchen vermutet, daß *Didymella exitialis*, *Fusarium solani*

und *Ophiobolus graminis* orchinolantigene Fähigkeiten besitzen; heute wissen wir, daß dies nicht zutrifft und daß unsere damaligen Vorversuche versteckten Kontaminationen mit Orchinol-induzierenden Bakterien zum Opfer gefallen waren.

Für die vorliegende Arbeit wurde deshalb die Kontrolle der Gewebewalzen auf Keimfreiheit nicht mehr in HELLERscher Nährlösung durchgeführt, sondern in sterilem Leitungswasser (rund pH 7); wenn dieses nach drei Tagen noch ungetrübt war, so kam es nur selten vor, daß die Gewebe noch klandestine Keime enthielten.

Zu allen diesen Schwierigkeiten tritt nun noch eine letzte, die uns viel zu schaffen machte: auch in sterilen (kontaminationsfreien) Knollengeweben kann nämlich zuweilen nach längerer Kultur (z. B. nach zehn und mehr Tagen) Orchinol auftreten. In intakten, kontaminationsfreien Knollen haben wir nie Orchinol, noch einen anderen Hemmstoff gefunden; durch die Verletzung beim Herausschneiden der Knollenfragmente oder der Gewebewalzen kann es jedoch offenbar geschehen, daß in ihnen gelegentlich in irgendeiner unspezifischen (und noch näher zu erforschenden) Weise der Mechanismus der Orchinolsynthese ausgelöst wird und daß sie dann Orchinol enthalten, obschon sie nicht mit antigenen Mikroorganismen zusammengebracht wurden und auch klandestin nicht von solchen besiedelt sind.

Wir werden später im Zusammenhang mit der chemischen Natur der Induktionsstoffe auf diese Frage zurückkommen.

2. KAPITEL. VERBREITUNG UND CHEMISCHE GRUNDLAGEN DER INFEKTABWEHR BEI DEN ORCHIDEEN

Die Fähigkeit zur manifesten Infektabwehr wurde in Tabelle 1 bei 24 erdbewohnenden Orchideenarten geprüft, die sämtlich der Unterfamilie der Ophrydeen angehören. Da die Beschaffung und Aufzucht genügender Mengen dieser Orchideen erhebliche Schwierigkeiten bereitet, mußten wir das Knollenmaterial möglichst ökonomisch verwenden und den Arbeitsgang umgekehrt disponieren als der formalen Logik entsprochen hätte.

Wir prüften deshalb zuerst im Kölbchenversuch die spezielle Frage, ob eine Orchideenart auf eine Infektion durch einen polyvalenten Mykorrhizenpilz, nämlich durch *Rhizoctonia repens* (isoliert aus den Wurzeln von *Orchis militaris*), mit der Synthese von Orchinol antworte (2. Spalte der Tab. 1); wenn ja, so ist sie zur manifesten Infektabwehr fähig, und ihre Knollenfragmente würden, wenn auf Agarplatten mit dem Pilze zusammengebracht, einen Hemmhof auslösen; dementsprechend wurden in der 4. Spalte der Tabelle 1 nur wenige der orchinolpositiven Arten (zur Kontrolle, die stets positiv ausfiel) auf ihre Hemmhofbildung geprüft. Nur bei den Orchideenarten, die kein Orchinol synthetisieren, stellte sich die allgemeine Frage, ob sie überhaupt zu einer Abwehrreaktion, die auf Agar zu einer Hemmhofbildung führt, fähig seien.

Tabelle 1

Die Fähigkeit einiger Orchideen, in ihren Knollengeweben unter der Einwirkung von *Rhizoctonia repens*, Stamm *Orchis militaris*, Abwehrstoffe, insbesondere diimid-positive Stoffe, zu synthetisieren

Wirtsart	Bildung von		Hemmung von *Rhizoctonia repens* auf Agarplatten
	Orchinol	p-Hydroxy-benzylalkohol	
Aceras anthropophora (L.) R. Br.	++	+	
Anacamptis pyramidalis (L.) Rich.	++	++	
Charmorchis alpina (L.) Rich.	+++	++	
Coeloglossum viride (L.) Hart.	+++	++	
Gymnadenia albida (L.) Hartm.[1])	+++	++	
Gymnadenia conopea (L.) R. Br.	?	?	+ oder ±
Gymnadenia odoratissima (L.) Rich.	+	+	
Loroglossum hircinum (L.) Rich.[2])	0	+	+
Loroglossum longibracteatum (Biv.) Moris[3])	+++	+	+
Nigritella nigra (L.) Rchb.[4])	++	+	
Ophrys apifera Huds.	0	0	±
Ophrys Arachnites (Scop.) Murray[5])	0	0	0
Orchis coriophora L.	?	++	±
Orchis latifolia L.	+	++	
Orchis maculata L.	0	0	0
Orchis mascula L.	+++	++	
Orchis militaris L.	++	++	+
Orchis Morio L.	+++	+++	+
Orchis sambucina L.	+++	++	
Orchis ustulata L.	0	?	±
Platanthera bifolia (L.) Rich.	0	0	0
Serapias Lingua L.	+++	++	
Serapias neglecta Not.	++	++	
Serapias vomeracea Burm.	++	++	

[1]) = *Coeloglossum albidum* Hartm. [2]) = *Himantoglossum hircinum* Sprengel. [3]) = *Barlia longibracteata* Parlat = *Aceras longibracteata* Rchbg. = *Orchis longibracteata* Biv. [4]) = *Nigritella angustifolia* Rich. [5]) = *Ophrys fuciflora* Crantz.

2. und 3. Spalte, Menge der gebildeten Stoffe: 0 = nicht nachweisbar, + bedeutet im Falle des Orchinols schätzungsweise rund 50 γ, ++ rund 100 γ, +++ rund 150 γ oder mehr je Gramm Frischgewicht, ? = Ergebnis nicht zuverlässig.

4. Spalte, Abstufungen der Reaktionsintensität: + = bildet einen typischen Hemmhof. ± = bildet in der Regel nicht einen typischen Hemmhof, besiedelt jedoch das Knollenfragment nicht, sondern wächst um dasselbe herum. 0 = Knollenfragment übt keine Hemmwirkung aus, sondern wird überwachsen.

§ 1. Die Verbreitung der Infektabwehr bei den Orchideen

Von den 24 geprüften Orchideenarten (Tab. 1) sind 21 imstande, auf eine herannahende Infektion durch *Rhizoctonia repens* (Stamm *Orchis militaris*) mit der Bildung einer deutlichen Hemmzone bzw. mit der Synthese

von Orchinol zu antworten. Bei drei Arten, nämlich bei *Ophrys Arachnites*, *Orchis maculata* und *Platanthera bifolia*, sind dagegen die Ergebnisse negativ: *Rhizoctonia repens* (Stamm *Orchis militaris*) induziert in ihren Knollen keine Abwehrreaktionen von der Art, wie wir sie hier suchen, sondern überwächst sie ungehemmt nach dem Schema der Abbildung 3.

Sind diese drei Arten überhaupt zur Infektabwehr unfähig, oder liegt die Ursache ihres Versagens in der Verwendung von *Rhizoctonia repens* als induzierendem Pilz, da ihnen vielleicht diese Pilzart als Reaktionspartner nicht kongenial ist?

Um dies zu prüfen, brachten wir bei *Ophrys Arachnites* und *Orchis maculata* (von *Platanthera bifolia* besaßen wir keine Knollen mehr) die Knollenfragmente mit je ihren spezifischen, aus eigenen oder nahe verwandten Wurzeln isolierten Mykorrhizenpilzen zusammen (Tab. 2). Das Ergebnis ist bei beiden Arten positiv: es kommt bei ihnen zur Ausbildung eines typischen Hemmhofes (Zeichen +, wie Abb. 1) oder zu einer weniger ausgeprägten, doch immerhin deutlichen Hemmung (Zeichen ±, wie Abb. 2). Beide Arten sind somit zur manifesten Infektabwehr fähig; nur vermag *Rhizoctonia repens* ihren Abwehrmechanismus nicht in Gang zu setzen.

Beim ersten Reaktionspaar (*Rhizoctonia anomala* — *Orchis maculata*) liegt die Ursache des geringen Hemmerfolges vielleicht in einer gewissen Degeneration des Pilzes, da der betreffende Burgeffsche Stamm schon seit mehr als 50 Jahren saprophytisch kultiviert wurde und nicht mehr kräftig gedeiht.

Sämtliche geprüften Orchideen (24 Arten) sind demnach zu antiinfektionellen Abwehrreaktionen gegenüber bestimmten Mykorrhizenpilzen fähig. Das Phänomen der Infektabwehr gegenüber Mykorrhizenpilzen ist somit bei den Orchideen eine Allgemeinerscheinung.

Diese fremdartig anmutende Abwehr der eigenen Mykorrhizenpilze hängt vielleicht mit dem zwiespältigen Charakter dieser Pilze zusammen: einerseits sind sie benigne Reaktionspartner, die mit jungen Embryonen und mit Wurzelspitzen echte symbiontische Lebensgemeinschaften eingehen, und anderseits sind sie für dieselben Pflanzen maligne, spezialisierte Parasiten, die sich (was den gewöhnlichen saprophytischen Pilzen des Erdbodens versagt ist) durch die intakte Rinde hindurch einen Weg in das Innere der Knollen bahnen und dort, wenn keine Abwehrreaktionen erfolgen, eine Allgemeinerkrankung (Fäulnis) einleiten würden.

§ 2. Die chemische Natur der Abwehrstoffe bei den Orchideen

Von den 24 geprüften Orchideenarten sind 16 laut Tabelle 1 imstande, unter der Einwirkung von *Rhizoctonia repens* (Stamm *Orchis militaris*) erhebliche Mengen von Orchinol zu synthetisieren. Bei zwei Arten ist das Ergebnis unsicher (Fragezeichen in der zweiten Spalte der Tab. 1); somit

Tabelle 2 Die Bildung von Hemmstoffen in den unter der Einwirkung je ihres

Pilzart	isoliert aus
Orcheomyces conopeae Burg.	*Gymnadenia conopea* (Nobécourt)
Rhizoctonia anomala Burg.	*Orchis maculata* (Originalkultur von BURGEFF)
Rhizoctonia asclerotica Burg.	*Ophrys apifera**
Rhizoctonia repens Bern.	*Orchis maculata**
Rhizoctonia Stahlii Burg.	*Orchis ustulata**
Rhizoctonia versicolor Müll. et Nüesch	*Loroglossum hircinum**

* Neuisolierung durch unser Institut.

können in ihren Geweben höchstens Spuren von Orchinol vorhanden gewesen sein. Bei 16 bzw. 18 Arten stellt demnach das Orchinol einen der Träger der Infektabwehr dar.

Sechs der geprüften Arten bilden zuverlässig kein Orchinol, und zwar weder im Zusammenwirken mit der wenig spezifischen *Rhizoctonia repens* (Tab. 1) noch im Zusammenwirken mit je ihrem spezifischen Mykorrhizenpilze, soweit ihre Prüfung möglich war (Tab. 2); dennoch sind sie zur manifesten Infektabwehr fähig; ihre Infektabwehr wird somit statt vom Orchinol von anderen antibiotisch wirkenden Stoffen getragen. Wir werden hierüber später berichten.

§ 3. Das Wirtsspektrum für die Bildung von Orchinol

Die 16 orchinolbildenden Arten der Tabelle 1 verteilen sich auf neun Gattungen; doch bleibt zu beachten, daß der Gattungsbegriff bei den Orchideen sehr verschiedenartig gehandhabt wird und daß infolgedessen zahlreiche fertile „Gattungs"-Bastarde existieren. Die Frage, ob eine unmittelbare Beziehung zwischen der natürlichen Verwandtschaft der neun Ophrydeengattungen und ihrer Fähigkeit zur Orchinolsynthese besteht, läßt sich deshalb zur Zeit kaum beantworten. Trotz dieser Vorbehalte darf immerhin gesagt werden, daß die Fähigkeit zur Orchinolsynthese innerhalb der Unterfamilie der Ophrydeen weder art- noch gattungsspezifisch ist.

Sämtliche orchinolbildenden Arten synthetisieren zu gleicher Zeit auch p-Hydroxy-benzylalkohol. Das gemeinsame Auftreten dieser beiden Stoffe (dem wir auch in Tab. 3 wieder begegnen werden) legt den Gedanken nahe, daß zwischen ihnen ein innerer Zusammenhang besteht. Anderseits synthetisieren laut Tabelle 1 die Knollengewebe von *Loroglossum hircinum* unter der Einwirkung von *Rhizoctonia repens* nur p-Hydroxy-benzylalkohol, dagegen kein Orchinol; die Induktion dieser beiden Stoffe erfolgt also wahrscheinlich unabhängig voneinander durch unterschiedliche Antigene.

Knollengeweben einiger Orchideen spezifischen Mykorrhizenpilzes *Tabelle 2*

kombiniert mit Knollenwalzen von	Bildung von		Hemmung auf Agarplatten durch Knollenfragmente des spezifischen Wirtes, aus dem sie isoliert wurden
	Orchinol	p-Hydroxybenzylalkohol	
Gymnadenia conopea	0	0	+
Orchis maculata	0	0	±
Ophrys Arachnites	0	0	+
Orchis maculata	0	0	+
Orchis ustulata	0	0	+
Loroglossum hircinum	0	0	+

Die Fähigkeit oder Unfähigkeit, Orchinol zu synthetisieren, ist innerhalb der verschiedenen Orchideengattungen verschieden verteilt. Bei *Serapias* vermögen sämtliche drei geprüften Arten reichlich Orchinol zu bilden. In der Gattung *Ophrys* sind umgekehrt beide untersuchten Arten zur Orchinolsynthese unfähig.

Die Gattung *Orchis* verhält sich uneinheitlich; fünf der geprüften Arten bilden zuverlässig Orchinol, zwei bilden keines. Eine Beziehung zwischen der Knollenform und der Fähigkeit zur Orchinolsynthese besteht innerhalb der Gattung *Orchis* nicht; die digitate *Orchis latifolia* bildet Orchinol, die ebenfalls digitate *Orchis maculata* bildet keines; die ungeteilte *Orchis mascula* bildet Orchinol, die ebenfalls ungeteilte *Orchis ustulata* bildet keines. Die orchinolbildende *Orchis sambucina* nimmt eine Zwischenstellung ein: ihre Knollen sind in der Jugend ungeteilt, können sich aber später an der Spitze gabeln oder fingerig verzweigen.

3. KAPITEL. DAS SPEKTRUM DER ANTIGENEN MIKROORGANISMEN

Im vorangehenden Kapitel wurde die Frage besprochen, welche Orchideenarten auf eine herannahende Infektion durch Mykorrhizenpilze (vor allem durch *Rhizoctonia repens*, Stamm *Orchis militaris*) mit der Synthese von Abwehrstoffen, insbesondere von Orchinol, antworten. Wir drehen nunmehr die Frage um:

a) Welche Mykorrhizenpilze und welche andern im Erdboden lebenden Pilze und Bakterien sind imstande, in den Knollengeweben einer bestimmten Orchidee, nämlich von *Orchis militaris*, eine manifeste Infektabwehr auszulösen; und

b) Induzieren diese Mikroorganismen in den Knollengeweben von *Orchis militaris* jeweils die Bildung von Orchinol als Träger der Hemmwirkung, oder lösen sie in ihnen statt oder neben dem Orchinol noch die Bildung von andern Hemmstoffen aus?

§ 1. Die antigenen Fähigkeiten einiger Mykorrhizenpilze

Als Mykorrhizenpilze standen eine Anzahl Stämme zur Verfügung, die ursprünglich von BERNARD und BURGEFF isoliert und dann im Centraalbureau voor schimmelcultures in Baarn weiterkultiviert worden sind.

Weitere Stämme wurden von den Mitarbeitern unseres Institutes isoliert. Einige von ihnen decken sich morphologisch und kulturell mit den BERNARDschen und BURGEFFschen Arten, nur daß sie teilweise von anderen Wirten stammen als die Originalkulturen. Dies entspricht der Erfahrung, daß eine bestimmte Pilzart nicht immer auf eine bestimmte Orchidee spezialisiert ist, sondern mit unterschiedlichen Orchideenarten eine Mykorrhizen-Partnerschaft eingehen kann.

Einige andere Neuisolierungen sind für die Wissenschaft neu; zwei von ihnen, nämlich *Hansfordia granulosa* und *Rhizoctonia versicolor*, beide gewonnen aus Wurzelspitzen von *Loroglossum hircinum*, besitzen gute antigene Fähigkeiten und werden uns in dieser Eigenschaft später beschäftigen. Wir beschreiben sie deshalb nachstehend als neue Arten:

1. *Hansfordia granulosa* E. Müller et J. Nüesch nov. spec.

Mycelium immersum et superficiale, hyphis hyalinis, 2—3 μ latis, rectis vel curvatis compositum, sclerotia globosa, ellipsoidea vel irregulariter rotundata, 100—200 μ diam., pallide flava formans. Conidiophora aggregata, brunnea, ramosa; stipes simplex, erectus, 100—200 μ altus, 3—4 μ latus; ramuli primarii pallide brunnei, simplices, paralleliter ordinati, 20—40 μ longi; ramuli secundarii pallide brunnei vel hyalini, 1—3 cellulis sporogenis hyalinis, fortiter denticulatis, 6—12 μ longis, 2—4 μ latis terminantur. Conidia acropleurogena in apice denticulorum singulatim oriunda, continua, hyalina, globosa, ellipsoidea vel ovata, 2—2,5 μ diam. Hab. in radicis *Loroglossi hircini* (L.) Rich. in Gallia meridionali.

Der sich verhältnismäßig langsam ausbreitende Pilz wächst in Reinkultur auf den verwendeten Nährmedien sowohl mit Substratmyzel als auch mit einem weißen, seidig glänzenden Luftmyzel; die Hyphen sind 2 bis 3 μ dick, gerade oder gekrümmt. Später bilden sich oberflächlich zahlreiche kugelige, ellipsoidische oder unregelmäßig knollige, 100 bis 200 μ große, hellgelbe Sklerotien aus dicht ineinander geflochtenen, vielfach gekrümmten und verzweigten Hyphen. Auf Malzagar sind die Kulturen wegen der zahlreichen Sklerotien auffallend körnig; auf andern Medien werden die Sklerotien zuweilen vom üppig entwickelten Luftmyzel überdeckt. Unter dem Einfluß des Pilzes bilden sich auch häufig Oxalatkristalle, die ältere Hyphen kragenartig umgeben.

Auf einigen Nährböden wie Hafermehlagar, Tomatensaftagar und auf sterilisiertem Reis vermag der Pilz zu sporulieren. Aus dem Myzel (Abb. 4) ragen 200 bis 300 μ hohe Konidienträger empor, die sich in primäre und diese in sekundäre Zweige gabeln und stellenweise einen dichten, graubraunen Filz bilden. Die Stiele sind 100 bis 200 μ hoch, 3 bis 4 μ dick, anfangs hyalin,

später braun; sie verzweigen sich meist einfach, seltener auch wirtelig. Während die primären Zweige untereinander häufig fast parallel verlaufen, divergieren die sekundären Zweige oft ziemlich stark. Die obersten ein bis drei Zellen der sekundären, seltener auch der primären Zweige sind fertil; ringsum sind sie mit zahlreichen Zähnchen besetzt, an denen einzeln an kurzen Stielchen die kugeligen, ellipsoidischen oder eiförmigen, 2 bis 2,5 μ großen, einzelligen, hyalinen oder in Masse grauen Konidien abgeschnürt werden (Abb. 5).

Im Temperaturversuch zeigt der Pilz kein ausgesprochenes Optimum; er wächst zwischen 18 und 27 ° ungefähr gleich gut; unterhalb 6 ° und oberhalb 30 °C hört das Wachstum praktisch gesprochen auf.

Hansfordia granulosa wurde aus den Wurzelspitzen von *Loroglossum hircinum* isoliert und als E. T. H. Stamm M 2986 in unsere Mykothek eingeordnet.

Die Imperfektengattung *Hansfordia* wurde von Hughes (1951) begründet mit der Typusart *Hansfordia ovalispora* Hughes. Alle bis jetzt in diese Gattung eingereihten Pilze wachsen saprophytisch oder parasitisch auf Blättern tropischer Pflanzen oder als Hyperparasiten auf anderen parasitischen Pilzen.

Nächst verwandt mit *Hansfordia* Hughes ist die Gattung *Verticicladium* Preuss, deren Typusart sich als Nebenfruchtform des Discomyceten *Desma-*

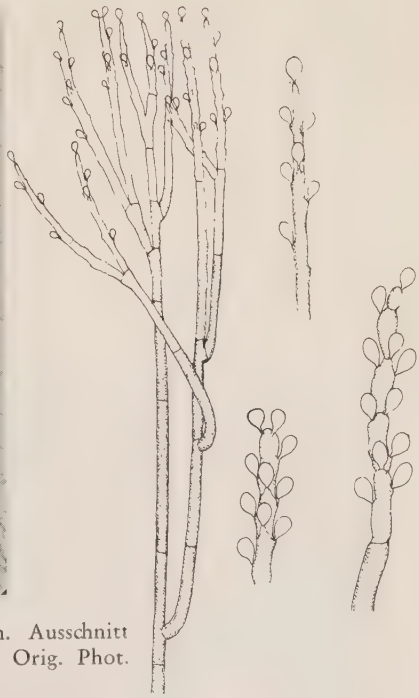


Abb. 4 (links). *Hansfordia granulosa* Müll. et Nüesch. Ausschnitt aus einem Rasen mit Konidienträgern. Vergr. 275. Orig. Phot. Inst. E. T. H.

Abb. 5 (rechts). *Hansfordia granulosa* Müll. et Nüesch. Links Konidienträger (Vergr. 500), rechts drei Enden von Konidienträgern mit Konidien (Vergr. 1000). Original E. Müller

zieriella acicola Lib. erwiesen hat (HUGHES 1951). Der Gedanke ist deshalb nicht abwegig, daß auch bei den *Hansfordia*-Arten Zusammenhänge mit Discomyceten bestehen könnten.

2. *Rhizoctonia versicolor* E. Müller et J. Nüesch nov. spec.

Mycelium lanatum, primo pallide cinereum, demum flavum, brunneum, gilvo-viride vel rubrum; substrato pigmentum flavum diffusum. Hyphae primariae 7—9 μ crassae, primo hyalinae, demum fuscae et verrucosae. Hyphae secundariae 2—3 μ crassae, hyalinae vel pallide flavae aut brunneae aut virides, glabrae vel verrucosae. Sclerotia rubra, tuberosa vel crustacea, dense hyphis composita. Pseudosporae ellipsoideae vel globosae, 8—14 μ diam., in catenis, hyalinae vel subfuscae. Hab. in radicis *Lorroglossi hircini* (L.) Rich. in Gallia meridionali.

Das sich auf allen verwendeten Nährmedien rasch ausbreitende, dicht wollige Myzel (Abb. 6) ist anfangs hellgrau, später gelb, braun, stellenweise auch gelbgrün oder rot gefärbt und scheidet ein gelbes, sich unter Einwirkung starker Säuren rot verfärbendes Pigment aus, das oft weit in das Substrat diffundiert. In jungen Kulturen lassen sich leicht Primär- und Sekundärhyphen (bei BURGEFF 1936 Lang- und Kurzhyphen genannt) unterscheiden, während in älteren Kulturen die Unterschiede sich verwischen. Die Primärhyphen sind 7 bis 9 μ dick und in 10 bis 30 μ lange Zellen gegliedert; sie treten einzeln oder zu mehreren in Strängen gebündelt auf. Anfangs sind sie hyalin, färben sich aber bald braun und erhalten eine warzig skulptierte Oberfläche. Die als Seitenzweige entstehenden Sekundärhyphen sind 2 bis 3 μ dick, bleibend hyalin oder gelblich, grünlich oder bräunlich gefärbt, glatt oder fein warzig skulptiert. Stellenweise bilden sich oberflächlich krustige oder knollige, rot gefärbte, aus ineinander geflochtenen, vielfach gekrümmten Hyphen bestehende Sklerotien von variabler Größe. In bestimmten Myzelpartien gehäuft, besonders auch in der Nähe der Sklerotien, werden Pseudokonidien gebildet. Sie sind kugelig oder ellipsoidisch, hyalin oder schwach graubraun, 8 bis 14 μ groß und entstehen oft in kurzen, ab und zu auch verzweigten Ketten.

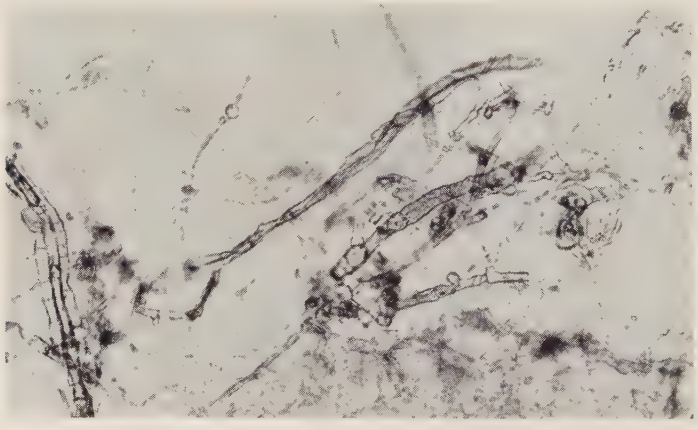


Abb. 6. *Rhizoctonia versicolor* Müll. et Nüesch. Breite, dunkler gefärbte Primär- und dünne, hyaline Sekundärhyphen. Vergr. 275. Orig. Phot. Inst. E. T. H.

Der ebenfalls aus Wurzelspitzen von *Loroglossum hircinum* (L.) Rich. isolierte Pilz wird als E. T. H. Stamm M 2982 in unserer Mykothek aufbewahrt. *Rhizoctonia versicolor* ist von *Orcheomyces hircini* Nobécourt verschieden. Wir konnten einen uns vom Autor zur Verfügung gestellten Stamm dieser von Nobécourt (1928) beschriebenen Art untersuchen. *Orcheomyces hircini* bildet weder Sklerotien, noch sind die Hyphen warzig skulptiert, und es fehlt auch die auffallende Färbung des Myzels.

Rhizoctonia versicolor wächst am besten bei 21 °C; bei 30 °C hört das Wachstum auf, während er bei Temperaturen von unter 6 °C noch ein schwaches Wachstum zeigt.

Abb. 7. *Rhizoctonia versicolor* Müll. et Nüesch. Unten junge, sklerotienartige Hyphengeflechte, in der Mitte Pseudokonidien-bildende Hyphenfragmente. Vergr. 275. Orig. Phot. Inst. E. T. H.

Wir scheiden in Tabelle 3 die 24 geprüften Mykorrhizenpilze auf Grund ihrer mutmaßlichen Hauptfruchtform in echte Rhizoctonien und in Hymenomyceten. Zu den echten Rhizoctonien stellen wir jene Stämme, deren Hauptfruchtform wahrscheinlich in die Familie der Corticiaceen gehört, ähnlich der *Rhizoctonia solani* (Hauptfruchtform *Corticium vagum* B. et C.) und der *Rhizoctonia crocorum* (Hauptfruchtform *Helicobasidium purpureum* Pat.).

Im Verband mit den beiden (mutmaßlichen) Hymenomyceten wurde auch *Armillaria mellea* (und zwar eine stark pathogene Rasse aus dem schweizerischen Nationalpark) geprüft, da eine japanische *Armillaria*-Rasse nach Kusano (1911) den Mykorrhizenpartner der chlorophyllosen japanischen Erdorchidee *Gastrodia elata* darstellt.

a) Die Verbreitung der antigenen Fähigkeiten bei den Mykorrhizenpilzen

Die Fähigkeit, in den Knollengeweben von *Orchis militaris* den Mechanismus der Infektabwehr in Gang zu setzen, ist nicht auf die besonderen Mykorrhizenpilze der *Orchis militaris* beschränkt: Nicht weniger als 19 von den 24 geprüften Mykorrhizenpilzen (Tab. 3) sind hierzu imstande; unter ihnen finden sich sowohl Isolierungen aus europäischen wie solche aus exoti-

schen (z. T. epiphytischen) Orchideen. Die geprüften Mykorrhizenpilze sind also hinsichtlich ihrer antigenen Fähigkeiten nur wenig spezialisiert.

Fünf der geprüften Pilze besitzen gegenüber *Orchis militaris* keine Induktionswirkung und überwachsen die ihnen vorgelegten Knollenfragmente scheinbar ungehemmt. Von diesen fünf Versagern dürfen wir zunächst *Armillaria mellea* wegstreichen, da sie nur aus literarischen Erwägungen mitgeprüft wurde und in der vorliegenden hochpathogenen Isolierung offenbar keinen Mykorrhizencharakter besitzt.

Bei den vier verbleibenden Versagern handelt es sich ausschließlich um Mykorrhizenpilze exotischer Orchideen, die der *Orchis militaris* wohl noch nie in ihrem Leben begegnet sind und ihr wohl auch nie begegnen werden; sie sind deshalb dem Lebensraum der *Orchis militaris* fremd.

Fassen wir in Tabelle 3 nur jene Mykorrhizenpilze ins Auge, die aus den Wurzeln europäischer Erdorchideen stammen, so sind ausnahmslos alle imstande, in den Knollengeweben von *Orchis militaris* den Mechanismus der Infektabwehr in Gang zu setzen.

Nicht nur stellt auf seiten des Wirtes (nämlich der Orchideen) die Fähigkeit zur Infektabwehr eine Allgemeinerscheinung dar (Tab. 1 und 2), sondern in analoger Weise kommt auch ihren Mykorrhizenpilzen die Fähigkeit, diese Infektabwehr in Gang zu setzen, ganz allgemein zu.

b) Quantitative Abstufungen im Induktionsvermögen der Mykorrhizenpilze

Quantitative Verschiedenheiten in den antigenen Fähigkeiten der geprüften Mykorrhizenpilze lassen sich in der 4. Spalte der Tabelle 3 aus der Höhe des induzierten Orchinolspiegels ablesen; das reagierende Objekt ist ja bei sämtlichen Reaktionspaaren dasselbe, nämlich *Orchis militaris*. Wenn somit erhebliche Verschiedenheiten im Orchinolgehalt der aktivierten Knollengewebe auftreten, so müssen sie durch entsprechende Verschiedenheiten im Ausmaß der Antigenbildung der betreffenden Pilze verursacht worden sein.

In diesem Sinne sind *Rhizoctonia mucoroides* von *Vanda suavis*, *Rhizoctonia repens* von *Cattleya mossia* und von *Orchis militaris* und *Orchis Morio*, und die beiden Hymenomyceten von *Epigonum nutans* und *Gastrodia callosa* kräftige Antigenbildner; denn sie induzieren in den Knollengeweben von *Orchis militaris* Orchinolgehalte von 150 und mehr Gamma je Gramm Knollenfrischgewicht. *Orcheomyces hircini* von *Loroglossum hircinum*, *Rhizoctonia mucoroides* von *Odontoglossum constrictum* und *Rhizoctonia* spec. von *Stanhopea tigrina* sind dagegen als spärliche Antigenbildner anzusprechen, da sie in den Knollengeweben von *Orchis militaris* nur Spuren von Orchinol, die in den gewöhnlichen Knollenextrakten nur andeutungsweise erkannt werden können, induzieren.

Eine Beziehung zwischen der Zugehörigkeit der verschiedenen Mykorrhizenstämme zu einer bestimmten Formart und der Größe ihres Induktionsvermögens besteht nicht; so ist innerhalb der *Rhizoctonia mucoroides* der Stamm von *Vanda suavis* ein sehr starker Antigenbildner, der Stamm von

Tabelle 3. Das Verhalten einiger Mykorrhizenpilze gegenüber den Knollen von *Orchis militaris* L. und gegenüber dem Orchinol

Testorganismus	Aus welchem Wirt und durch wen isoliert	Hemmung auf Agarplatten durch Knollenfragmente von *Orchis militaris*	Induziert in den Knollen von *Orchis militaris* die Bildung von		Beginn der Wachstumshemmung durch Orchinol molar
			Orchinol	p-Hydroxybenzylalkohol	
a) Echte Rhizoctonien					
Orcheomyces conopeae Burg.	*Gymnadenia conopeae* (Nobécourt)	+	+	+	$10^{-2,5}$
Orcheomyces hircini Nobéc.	*Loroglossum hircinum* (Nobécourt)	±	±	+	10^{-2}
Rhizoctonia anomala Burg.	*Orchis maculata* (Burgeff)	+	+	+	0
	Orchis maculata (Inst. spez. Bot. E. T. H.)	+	0	0	—
Rhizoctonia floccosa Burg.	*Myrmechis glabra* (Burgeff)	0	0	0	—
	Myrmechis gracilis (Burgeff)	0	0	0	0
Rhizoctonia lanuginosa Bern.	Originalkultur von BERNARD, wahrscheinlich von *Odontoglossum grande*	+	+	+	10^{-5}
Rhizoctonia mucoroides Bern.	Originalkultur von BERNARD, wahrscheinlich von *Phalaenopsis amabilis*	0	0	0	$10^{-3,5}$
	Cystopus candidus (Burgeff)	±	+	+	10^{-3}
	Odontoglossum constrictum (Burgeff)	±	±	+	10^{-3}
	Phalaenopsis Schilleriana (Burgeff)	±	+	+	10^{-4}
	Vanda suavis (Burgeff)	+	+ + +	+	$10^{-3,5}$
	Vanda tricolor (Burgeff)	±	+	+	$10^{-3,5}$
Rhizoctonia repens Bern.	*Vrijdagzynea albida* (Burgeff)	0	0	0	$10^{-2,5}$
	Cattleya mossia (Burgeff)	+	+ + +	+	—
	Cymbidium spec. (Burgeff)	+	+	+	$10^{-3,5}$
	Orchis militaris (Inst. spez. Bot. E. T H.)	+	+ + +	+	10^{-2}
	Orchis Morio (Vermeulen)	+	+ + +	+	10^{-2}
Rhizoctonia spec.	*Ophrys tenthredinifera* (Burgeff)	+	0	0	10^{-3}
	Stanhopea tigrina (Burgeff)	0	±	+	10^{-3}
Rhizoctonia Stahlii Burg.	*Platanthera chlorantha* (Burgeff)	±	0	0	—
b) Hymenomyceten					
Armillaria mellea (Vahl) Quél.	*Pinus silvestris* (Bazzigher)	0	0	0	—
Mycelium radicis Burg.	*Epigonum nutans* (Burgeff)	+	+ + +	+	$10^{-3,5}$
	Gastrodia callosa (Burgeff)	+	+ + +	+	$10^{-3,5}$

3. Spalte, Abstufungen der Reaktionsintensität: + = bildet einen ausgeprägten Hemmhof nach Art der Abbildung 1. ± = bildet in der Regel nicht einen typischen Hemmhof, besiedelt jedoch das Knollenfragment nicht, sondern wächst nach Art der Abbildung 2 um dasselbe herum. 0 = das Knollenfragment übt keine Hemmwirkung aus, sondern wird nach Art der Abbildung 3 überwachsen.

4. Spalte, Menge des gebildeten Orchinols: 0 = nicht nachweisbar. ± = Spuren, die nur in besonders angreicherten Extrakten erfaßt werden können. + bedeutet rund 50 Gamma, + + rund 100 Gamma, + + + 150 oder mehr Gamma Orchinol je Gramm Knollenfrischgewicht.

Odontoglossum constrictum nur ein sehr schwacher, und die Stämme von *Phalaenopsis amabilis* und *Vrijdagzynea albida* sind gegenüber *Orchis militaris* überhaupt unwirksam. In ähnlicher Weise vermag laut Tabelle 3 der von BURGEFF isolierte Stamm der *Rhizoctonia anomala* von *Orchis maculata* in den Knollengeweben von *Orchis militaris* die Bildung von Orchinol zu induzieren, der von unserem Institut isolierte Stamm derselben Art dagegen nicht.

Die in der ersten Spalte der Tabelle 3 aufgeführten Formarten sind somit in ihren physiologischen Fähigkeiten nicht einheitlich.

Alle diese Qualifikationen des kräftigen oder schwachen Antigenbildners gelten jedoch, solange wir die chemische Natur der Induktionsstoffe nicht kennen und deshalb die betreffenden Antigene nicht unmittelbar als solche quantitativ bestimmen können, nur gegenüber *Orchis militaris* als Reaktionspartner; gegenüber anderen Orchideen kann der Induktionserfolg eines bestimmten Pilzstammes anders ausfallen. *Orcheomyces conopeae* von *Gymnadenia conopea* besitzt beispielsweise nach Tabelle 3 die antigenen Fähigkeiten, um in den Knollengeweben von *Orchis militaris* die Synthese von Orchinol zu induzieren. Bringt man ihn dagegen mit Knollen von *Gymnadenia conopea* zusammen (Tab. 2), so induziert er in ihnen kein Orchinol, weil sie offenbar überhaupt kein Orchinol zu synthetisieren vermögen; aber er setzt in ihnen einen anderen Abwehrmechanismus in Gang, der zur Bildung eines anderen Abwehrstoffes führt; denn er wird laut der letzten Spalte der Tabelle 2 von den Knollenfragmenten der *Gymnadenia conopea* trotz der Abwesenheit von Orchinol gehemmt.

Je nach dem geprüften Orchideenpartner wird man deshalb dem *Orcheomyces conopeae* andere antigene Fähigkeiten zuschreiben.

Die quantitativen Abstufungen des Induktionsvermögens kommen indirekt auch in der Intensität der Hemmhofbildung (3. Spalte der Tab. 3) zum Ausdruck. Nur wirken hier völlig heterogene Komponenten zusammen, von seiten der *Orchis militaris* die (mindestens) zwei induzierten Abwehrstoffe und von seiten der Pilzstämme das unterschiedliche Induktionsvermögen und vor allem die unterschiedliche Empfindlichkeit für die induzierten Abwehrstoffe; der beste Antigenproduzent wird ja seine Produktionsleistung vorzeitig drosseln, wenn er z. B. wegen hoher Orchinolempfindlichkeit übermäßig unter dem von ihm induzierten Orchinol leidet.

Stellt man (als Endeffekt aus all diesen widerstrebenden Komponenten) auf den Hemmerfolg ab, wie er sich in der Intensität der Hemmhofbildung auf Agarplatten zu erkennen gibt, so würde man in Tabelle 3 zwölf der geprüften Mykorrhizenpilze als starke Antigenbildner ansprechen, da sie bei den Knollenfragmenten der *Orchis militaris* typische Hemmhöfe nach Art der Abbildung 1 auslösen. Sechs würde man als schwache Antigenbildner bezeichnen, da sie nur einen unzulänglichen Hemmhof nach Art der Abbildung 2 veranlassen. Bei einem niedrigen Orchinolspiegel, so beim Reaktionspaar *Stanhopea tigrina—Orchis militaris*, kann auf dem Agar die visuelle

Hemmung gänzlich ausbleiben, weil der biologische Hemmungstest weniger empfindlich anspricht als der papierchromatographische Orchinolnachweis (Bruchteile von Gamma); man würde dann wegen des Fehlens der Hemmhofbildung dem betreffenden Erreger überhaupt keine antigenen Fähigkeiten zutrauen.

Bei drei Hemmhofbildnern, nämlich bei *Rhizoctonia anomala* von *Orchis maculata* (Stamm BURGEFF), bei *Rhizoctonia lanuginosa* von *Odontoglossum grande* und bei *Rhizoctonia* spec. von *Ophrys tenthredinifera*, ist die gehemmte Myzelfront (und bei *Rhizoctonia lanuginosa* auch der Agar vor der Myzelfront) braun verfärbt; somit vollziehen sich zwischen den Ausscheidungen dieser drei Pilze und den Ausscheidungen der Knollengewebe von *Orchis militaris* noch besondere chemische Umsetzungen.

c) Qualitative Verschiedenheiten in den antigenen Fähigkeiten der Mykorrhizenpilze

Neben den soeben besprochenen quantitativen Abstufungen in der antigenen „Begabung" der Mykorrhizenpilze bestehen zwischen ihnen auch grundsätzliche qualitative Verschiedenheiten.

Im Mittelpunkt unserer bisherigen Arbeiten über die chemische Infektabwehr bei den Orchideen stand das Orchinol; denn es ist der erste (und bis jetzt einzige) Antikörper, der kristallin vorliegt. Ist aber das Orchinol der einzige Antikörper, dessen Bildung die Mykorrhizenpilze in den Orchideenknollen induzieren können? Wir möchten diese Frage aus zwei Gründen verneinen.

1. Der *Rhizoctonia*-Stamm von *Ophrys tenthredinifera* und der von unserem Institut isolierte Stamm der *Rhizoctonia anomala* von *Orchis maculata* induzieren laut Tabelle 3 in den Knollengeweben von *Orchis militaris* kein Orchinol und werden doch von ihnen auf Agar gehemmt; sie vermögen somit in ihnen den Mechanismus der Orchinolsynthese nicht in Gang zu setzen, wohl aber einen anderen Abwehrmechanismus, der zur Bildung eines anderen Hemmstoffes führt.

Anderseits beweist dieses Ergebnis, daß die Knollengewebe von *Orchis militaris* nicht nur Orchinol, sondern noch (mindestens) einen zweiten Hemmstoff synthetisieren können. Wird dieser zweite Hemmstoff (wie in den zwei genannten Beispielen) statt des Orchinols gebildet, oder kann er bei orchinolinduzierenden Reaktionspaaren auch neben dem Orchinol gebildet werden? Wir dürfen vielleicht vorwegnehmen, daß der zweite Hemmstoff (zum mindesten beim Reaktionspaar *Rhizoctonia repens*—*Orchis militaris*) neben dem Orchinol synthetisiert wird und bei unserer bisherigen, auf Orchinol ausgerichteten Aufarbeitung zur Hauptsache verlorenging.

Die antigenen Fähigkeiten der *Rhizoctonia* spec. von *Ophrys tenthredinifera* und der *Rhizoctonia anomala* von *Orchis maculata* sind somit von denjenigen der *Rhizoctonia repens* (Stamm *Orchis militaris*) qualitativ verschieden: Die beiden ersteren Pilze vermögen in den Knollengeweben von

Orchis militaris nur die Synthese des zweiten Hemmstoffes zu induzieren, die *Rhizoctonia repens* von *Orchis militaris* dagegen sowohl die Bildung von Orchinol als auch diejenige des zweiten Hemmstoffes.

2. *Rhizoctonia repens* von *Orchis militaris* und *Rhizoctonia versicolor* von *Loroglossum hircinum* lösen nach Tabelle 1 und 2 in den Knollengeweben von *Loroglossum hircinum* kein Orchinol aus; desgleichen induzieren nach Tabelle 2 einige andere Mykorrhizenpilze in ihren spezifischen Orchideen kein Orchinol, sondern alle diese Pilze setzen in den betreffenden Knollengeweben andere Abwehrmechanismen in Bewegung; denn sie werden von ihnen trotz der Abwesenheit von Orchinol zur Hemmhofbildung veranlaßt.

Diese qualitativen Verschiedenheiten in der antigenen „Begabung" der Mykorrhizenpilze werden sich erst aus der Kenntnis der chemischen Natur der Antigene verstehen lassen.

§ 2. Die antigenen Fähigkeiten einiger mit *Orchis purpurella* symbiontisch lebender Stämme der *Rhizoctonia solani* Kühn.

Orchis purpurella T. et T. A. Steph., eine digitate Kleinart aus dem Verwandtschaftskreis unserer mitteleuropäischen *Orchis latifolia* L., lebt in Schottland in Mykorrhizengemeinschaft mit verschiedenartigen Stämmen der *Rhizoctonia solani* Kühn (DOWNIE 1959 a, b). Ein bodenbewohnender Pilz, den wir als kosmopoliten Parasiten aller möglichen Blütenpflanzen kennen, und der beispielsweise in Mitteleuropa in Orchideenwurzeln auch als echter Parasit gefunden wurde, vermag somit unter bestimmten Voraussetzungen eine symbiontische Lebensgemeinschaft mit den Wurzeln einer erdbewohnenden Orchidee einzugehen. Dieses Beispiel bildet eine Parallele zu der im vorangehenden Paragraphen erwähnten *Armillaria mellea*, die bei uns als Parasit an mannigfachen Blütenpflanzen auftritt, jedoch (in einer anderen Rasse) in Japan symbiontisch mit der Erdorchidee *Gastrodia elata* lebt.

Sämtlichen von DOWNIE (1959 b) aus *Orchis purpurella* isolierten Stämmen der *Rhizoctonia solani* ist gemeinsam, daß sie mit keimenden Samen von *Orchis purpurella* echte Symbiosen eingehen und die Keimpflanzen zu rascherem Wachstum anregen. Gegenüber den keimenden Samen anderer terrestrischer Orchideen können sie sich dagegen unterschiedlich verhalten, von Beziehungslosigkeit bis einerseits zu Symbiose (Mykorrhizenbildung) und anderseits bis zum Parasitismus. In Erweiterung dieser Befunde konnte DOWNIE (1959 a) zeigen, daß auch Orchideen-fremde Stämme der *Rhizoctonia solani*, die aus den Wurzeln irgendwelcher Blütenpflanzen isoliert wurden, gegenüber keimenden Orchideensamen eine ähnliche Breite des biologischen Verhaltens wie die echten Mykorrhizenpartner aufweisen, von Symbiose bis einerseits zu Beziehungslosigkeit und anderseits bis zum Parasitismus. *Rhizoctonia solani* ist somit, was bisher unserem Denkbilde fremd war, wie *Armillaria mellea* ein potentieller Mykorrhizenpilz.

In Tabelle 4 wurden aus den zahlreichen von DOWNIE isolierten und geprüften Stämmen der *Rhizoctonia solani* zehn ausgewählt, drei aus den Wur-

Tabelle 4

Das Verhalten einiger von D. G. Downie isolierter Stämme der *Rhizoctonia solani* gegenüber den Knollen von *Orchis militaris* und gegenüber dem Orchinol

Nummer	Ursprünglich isoliert aus den Wurzeln von	Verhalten gegenüber keimenden Samen von		Hemmung auf Agarplatten durch Knollenfragmente von *Orchis militaris*	Induziert in den Knollen von *Orchis militaris* die Bildung von		Beginn der Wachstumshemmung durch Orchinol molar
		Orchis purpurella	*Orchis ericetorum*		Orchinol	p-Hydroxybenzylalkohol	
L 10	*Orchis purpurella*	S	S	0	0	0	$10^{-3,5}$
B 12	*Orchis purpurella*	S	0	0	0	0	10^{-4}
C 1	*Orchis purpurella*	S	P+	0	0	0	10^{-4}
RS 12	*Agrostis* spec.	S	S	0	0	0	10^{-4}
CS 1	*Triticum vulgare*	s	0	0	0	0	$10^{-3,5}$
RS 11	*Elaeis guyanensis*	0	P	0	0	0	—
RS 10	*Oryza sativa*	S	S	0	0	0	$10^{-3,5}$
RS 5	*Brassica oleracea*	s	P+	0	0	0	—
RS 1	*Solanum lycopersicum*	S	S—	0	0	0	10^{-4}
RS 6	*Solanum tuberosum*	s	0	0	0	0	10^{-4}

3. und 4. Spalte, Formen der Lebensgemeinschaft mit jungen Embryonen:

S = Symbiose und rasches Wachstum der Keimpflanzen.
s = Symbiose und langsames Wachstum der Keimpflanzen.
S— = Instabile Symbiose, d. h. die Samen keimen nur in geringer Zahl bzw. die meisten Keimpflanzen sterben frühzeitig ab.
0 = keine Infektion.
P+ = erst Stimulation, dann Parasitismus.
P = Parasitismus.

5. bis 7. Spalte, Reaktionserfolg:

0 = Ausbleiben jeglicher Hemmung bzw. Ausbleiben der Induktion von Antikörpern.

zeln von *Orchis purpurella,* vier aus den Wurzeln anderer Monokotylen und drei aus Dikotylenwurzeln isoliert. In der 3. und 4. Spalte wurde auf Grund der Befunde von Downie das Verhalten dieser Pilze gegenüber keimenden Samen von *Orchis purpurella* und von *Orchis ericetorum* in Stichworten charakterisiert; es bewegt sich wiederum von Beziehungslosigkeit bis zur Symbiose und bis zum Parasitismus. Besitzen diese Stämme, die sich gegenüber *Orchis purpurella* und *Orchis ericetorum* wie echte Mykorrhizenpilze verhalten, ähnliche antigene Fähigkeiten wie die Mykorrhizenpilze der Tabelle 3?

Als Ersatz für *Orchis purpurella,* die uns unerreichbar ist, arbeiteten wir mit den Knollen von *Orchis militaris* (Tab. 4), also mit einer systematisch entfernten Art. Keiner der zehn geprüften Stämme der *Rhizoctonia*

solani zeigt zu *Orchis militaris* irgendeine Beziehung. Sie vermögen auf Agarplatten bei ihren Knollenfragmenten keine Hemmwirkung auszulösen, sondern überwachsen sie in geradezu vorbildlicher Weise (Abb. 3!); desgleichen vermögen sie in ihnen weder die Bildung von Orchinol noch von p-Hydroxy-benzylalkohol zu induzieren; sie sind somit als Reaktionspartner noch weniger „begabt" als zwei unserer eigenen Stämme der *Rhizoctonia solani* (Tab. 5), von denen der eine in den Knollengeweben von *Orchis militaris* doch zum mindesten die Bildung von p-Hydroxy-benzylalkohol hervorruft.

Tabelle 5

Das Verhalten einiger bodenbewohnender Pilze gegenüber den Knollen von *Orchis militaris* L. und gegenüber dem Orchinol

Testorganismen	Hemmung auf Agarplatten durch Knollenfragmente von *Orchis militaris*	Induziert in den Knollen von *Orchis militaris* die Bildung von		Beginn der Wachstumshemmung durch Orchinol molar
		Orchinol	p-Hydroxybenzylalkohol	
Phycomyceten				
Mucor spinosus v. Tiegh.	0	0	0	10^{-3}
Pythium de Baryanum Hesse	0	0	0	$10^{-2,5}$
Rhizopus nigricans Ehrenb.	0	0	0	10^{-4}
Ascomyceten				
Alternaria tenuis auct.	0	0	?	$10^{-2,5}$
Aspergillus clavatus Desm.	0	0	0	10^{-2}
Aspergillus flavus Link	0	0	0	10^{-2}
Aspergillus fumigatus Fres.	0	0	?	10^{-3}
Aspergillus niger v. Tiegh.	0	0	+	0
Botrytis cinerea Pers.	0	0	0	10^{-2}
Cladosporium fulvum Cke.	0	0	0	$10^{-3,5}$
Didymella exitialis (Mor.) E. Müll.	+	0	0	$10^{-3,5}$
Fusarium culmorum (W. G. Sm.) Sacc.	0	0	?	$10^{-3,5}$
Fusarium lycopersici Sacc.	0	0	0	10^{-4}
Fusarium Martii App. et. Wr.	0	0	0	10^{-4}
Fusarium solani (Mart.) App. et Wr.	0	0	+	10^{-3}
Neurospora sitophila (Mont.) Shear et Dodge	0	0	—	$10^{-3,5}$
Ophiobolus graminis Sacc.	±	0	0	0
Penicillium citreo-viride Biourge	0	0	?	10^{-2}
Penicillium citrinum Thom	0	0	0	0
Thielavia terricola (Gil. et Abb.) Emm.	±	0	+	0
Trichoderma viride Pers.	0	0	0	10^{-3}
Basidiomyceten				
Rhizoctonia crocorum DC.	0	0	0	—
Rhizoctonia solani Kühn von *Pinus silvestris*	0	0	0	10^{-3}
Rhizoctonia solani Kühn von *Solanum tuberosum*	0	0	+	10^{-3}

2. Spalte, Abstufungen der Reaktionsintensität: + = bildet einen ausgeprägten Hemmhof nach Art der Abbildung 1. ± = bildet in der Regel nicht einen typischen Hemmhof, besiedelt jedoch das Knollenfragment nicht, sondern wächst nach Art der Abbildung 2 um dasselbe herum.

Dieses Ergebnis ist überraschend; denn die der *Orchis purpurella* nahestehende und zuweilen mit ihr vereinigte *Orchis latifolia* synthetisiert nach Tabelle 1 unter der Einwirkung von *Rhizoctonia repens* sowohl Orchinol als auch p-Hydroxy-benzylalkohol. Trotz dieses negativen Ergebnisses besitzt *Orchis purpurella* zweifelsohne gegenüber *Rhizoctonia solani* die Fähigkeit zur Infektabwehr; anders wären die Abstufungen innerhalb ihrer Reaktionsgemeinschaft (3. und 4. Spalte der Tab. 4) nicht zu verstehen. Nur beruht offenbar diese Infektabwehr auf anderen Mechanismen als bei *Orchis militaris*, nämlich auf solchen, die durch *Rhizoctonia solani* in Gang gesetzt werden können.

Vielleicht gelingt es einmal, für diesen Reaktionstypus ein mitteleuropäisches Beispiel zu finden, mit dem wir dann arbeiten können.

§ 3. Die antigenen Fähigkeiten einiger bodenbewohnender Pilze und Bakterien

Versuchsfrage: Welche bodenbewohnenden Nicht-Mykorrhizenpilze und welche Bakterien sind imstande, in den Knollengeweben von *Orchis militaris* Abwehrreaktionen, die auf Agar zur Bildung von Hemmhöfen führen, und insbesondere die Synthese von Orchinol auszulösen?

Unter den 24 geprüften bodenbewohnenden Pilzen (Tab. 5) löst einer, *Didymella exitialis* (Mor.) E. Müll., auf Agarplatten mit Knollenfragmenten von *Orchis militaris* einen Hemmhof nach Art der Abbildung 1 aus. Bei zwei, nämlich *Ophiobolus graminis* Sacc. und *Thielavia terricola* (Gil. et Abb.) Emm., erfolgt eine schwächere Hemmung nach Art der Abbildung 2.

Tabelle 6

Das Verhalten einiger bodenbewohnender Bakterien gegenüber den Knollen von *Orchis militaris* L. und gegenüber dem Orchinol

Testorganismus	Induziert in den Knollen von *Orchis militaris* die Bildung von		Beginn der Wachstumshemmung durch Orchinol molar
	Orchinol	p-Hydroxy-benzylalkohol	
Bacillus Megatherium de By.	0	0	0
Bacillus subtilis Cohn	0	?	±
Erwinia carnegieana Lightle et al.	+++	+	0
Erwinia nimipressuralis Carter	+++	+	0
Escherichia coli (Mig.) Cast.	0	+	0
Pseudomonas putida (Trev.) Mig.	+++	+	0
Staphylococcus aureus Rosenb.	0	+	±

2. Spalte, Menge des gebildeten Orchinols: +++ = 150 oder mehr Gamma Orchinol je Gramm Knollenfrischgewicht.

Letzte Spalte, Beginn der Wachstumshemmung durch Orchinol: ± = Wachstumshemmung launisch, nicht zuverlässig reproduzierbar.

Die übrigen 21 geprüften Pilze besitzen gegenüber *Orchis militaris* keine antigenen Fähigkeiten und überwachsen die ihnen vorgelegten Knollenfragmente scheinbar ungehemmt nach Art der Abbildung 3.

Die stofflichen Grundlagen der drei größeren oder geringeren Hemmeffekte sind unbekannt; jedenfalls beruhen sie (nach Spalte 3 der Tab. 5) nicht auf der Bildung von Orchinol; denn keiner der 24 willkürlich herausgegriffenen und in Tabelle 5 geprüften saprophytischen oder fakultativ parasitischen Pilze des Erdbodens ist imstande, in den Knollengeweben von *Orchis militaris* die Synthese von Orchinol zu induzieren. Ihre antigene „Begabung" ist somit gering.

Von den in Tabelle 6 besprochenen bodenbewohnenden Bakterien haben wir drei (deren Bestimmung wir Herrn dipl. ing. agr. K. STEINER vom landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut unserer Hochschule verdanken), nämlich *Erwinia carnegieana, Erwinia nimipressuralis* und *Pseudomonas putida,* unmittelbar aus den peripheren Gewebeschichten der Knollen von *Orchis militaris* isoliert. Sie scheinen nicht zufällig dort hinein gekommen zu sein; denn wir trafen sie (im Gegensatz zu anderen bodenbewohnenden Bakterien wie *Bacillus Megatherium* de By. und *Bacillus subtilis* Cohn) in intakten Knollen von *Orchis militaris* mit einer gewissen Regelmäßigkeit an. Sie nehmen offenbar unter den Bakterien, die durch verletzte Gefäßbündel, absterbende Wurzeln usw. in die peripheren Knollenschichten hineinwuchern können, eine Sonderstellung ein und sind irgendwie als Kommensalen oder Raumparasiten der Knollengewebe bevorzugt.

Daß es mit ihnen eine besondere Bewandtnis haben muß, möchten wir auch deshalb vermuten, weil ihr Stoffwechsel auf denjenigen von *Orchis militaris* abgestimmt ist; denn alle drei sind nach Tabelle 6 imstande, in den Knollen von *Orchis militaris* die Synthese von p-Hydroxy-benzylalkohol und von Orchinol auszulösen, letzteres sogar in einem Ausmaß, das den antigen-kräftigsten Mykorrhizenpilzen gleichkommt. Die Fähigkeit, in den Knollen von *Orchis militaris* den Abwehrmechanismus, der zur Synthese von Orchinol führt, in Gang zu setzen, ist somit nicht streng auf die echten Mykorrhizenpilze beschränkt, sondern sie findet sich ausnahmsweise auch bei bestimmten saprophytischen (oder halbparasitischen?) bodenbewohnenden Bakterien.

Die vier weiteren geprüften Bakterien, *Bacillus Megatherium, Bacillus subtilis, Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus,* sind sämtlich „unspezifisch", d. h. sie stehen zu *Orchis militaris* in keinerlei Beziehung. Sie sind denn auch laut Tabelle 6 sämtlich unfähig, in den Knollen dieser Orchidee den Mechanismus der Orchinolsynthese in Gang zu setzen. In dieser Hinsicht stimmen sie mit den unspezifischen bodenbewohnenden Pilzen überein.

4. KAPITEL. DAS WIRKUNGSSPEKTRUM DES ORCHINOLS

In einer früheren Mitteilung (GÄUMANN und KERN 1959 b, S. 16) haben wir auf Grund einiger Tastversuche vermutet, daß das Wirkungsspektrum des Orchinols verhältnismäßig breit und wenig spezifisch sei. Wir möchten hier diese Angaben an Hand eines umfassenderen Materials bestätigen. Die Versuche wurden von unsern Mitarbeitern Dr. R. BOSSI und R. BRAUN, dipl. Naturwissenschafter E. T. H., in der folgenden Weise durchgeführt.

Die zu prüfenden Pilze und Bakterien wurden wie für die Versuche der beiden vorangehenden Kapitel auf Agar kultiviert. Dann wurden Filterscheiben von 6 mm Durchmesser in verschieden konzentrierte alkoholische Orchinollösungen (absolutes Äthanol) getaucht, an Filterpapier abgestreift, trocknen gelassen und (statt der Knollenfragmente im 2. und 3. Kapitel) etwa 7 bis 9 mm vor die heranwachsende Myzelfront auf die Testplatten gelegt. Bei den Bakterien wurde die in der Antibiotikaforschung übliche Prüfungsmethode verwendet.

Ein Filterscheibchen nimmt etwa 2,5 mm^3 Flüssigkeit auf, was bei der Konzentration der Orchinollösung von $3{,}16 \cdot 10^{-3}$ molar etwa der Menge von 2 Gamma Orchinol je Filterscheibchen entspricht. Die Ablesung erfolgte in der Regel nach zwei Tagen. Als Schwellenwert für die „beginnende Hemmung" wurde in der letzten Spalte der Tabellen 3 bis 5 die Konzentration eingetragen, bei der das Wachstum des Mikroorganismus gegen die Filterscheibchen hin gerade nicht mehr gehemmt wird.

a) Die Orchinolempfindlichkeit der Mykorrhizenpilze

Von den 19 geprüften echten Mykorrhizenpilzen werden laut Tabelle 3 17 durch Orchinol in ihrem Wachstum gehemmt. Die meisten dieser orchinolempfindlichen Mykorrhizenpilze setzen aber ihrerseits in den Knollengeweben von *Orchis militaris* den Mechanismus der Orchinolsynthese in Gang. Sie lösen also in den Wirten, die sie zu befallen im Begriff sind, selbst den Abwehrmechanismus aus, der ihnen beim Eindringen in die Gewebe entgegenwirkt und sie dann hemmt.

Die Stämme der *Rhizoctonia mucoroides* von *Phalaenopsis amabilis* und von *Vrijdagzynea albida* lösen bei *Orchis militaris* keine Orchinolbildung aus und sind doch orchinolempfindlich; anderseits induziert *Rhizoctonia anomala* (Stamm BURGEFF) von *Orchis maculata* in den Knollengeweben von *Orchis militaris* die Orchinolsynthese, ist aber selbst orchinolunempfindlich. *Rhizoctonia floccosa* von *Myrmechis gracilis* steht endlich diesem ganzen Lebensbereich fern, induziert bei *Orchis militaris* kein Orchinol und spricht auf Orchinol auch nicht an.

Das Ausmaß der Orchinolempfindlichkeit bewegt sich bei den meisten Mykorrhizenpilzen in einem ähnlichen Rahmen; die meisten Hemmungsschwellen in der letzten Spalte der Tabelle 3 liegen bei Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-4} molar. *Rhizoctonia lanuginosa* von *Odontoglossum grande* ist mit einem Schwellenwert von 10^{-5} molar am stärksten orchinolempfind-

lich; *Orcheomyces hircini* von *Loroglossum hircinum* und *Rhizoctonia repens* von *Orchis militaris* und *Orchis Morio* sprechen dagegen auf Orchinol am wenigsten an (Schwellenwert 10^{-2} molar).

Sind diese Schwellenwerte im Rahmen des in den Orchideenknollen sich abspielenden Infektions- und Reaktionsgeschehens sinnvoll? In den Knollen von *Orchis militaris* entsteht bei einer Infektion durch *Rhizoctonia repens* (Stamm *Orchis militaris*) rund um den Focus herum eine etwa 6 mm breite Immunitätsbarriere, innerhalb welcher die durchschnittliche Orchinolkonzentration im Zellsaft 10^{-3} bis 10^{-2} molar beträgt (GÄUMANN und HOHL 1960). Der Abwehrspiegel in dieser Abwehrzone ist somit hoch genug, um auch wenig orchinolempfindliche Erreger wie *Rhizoctonia repens* (Stamm *Orchis militaris*) abzudämmen und ihnen das Übergreifen auf die intakten Knollengewebe unmöglich zu machen.

Jenseits der Immunitätsbarriere ist dagegen der vom Orchinol getragene Infektionsschutz gegen Mykorrhizenpilze erheblich geringer. Der durchschnittliche Orchinolgehalt der Gewebe mag dort mit der Zeit auf etwa 110 Gamma je g Frischgewicht steigen (GÄUMANN und HOHL, l. c.), entsprechend einer durchschnittlichen Orchinolkonzentration im Zellsaft von etwa $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ molar. Nach der letzten Spalte der Tabelle 3 liegt bei 8 der 19 geprüften Mykorrhizenpilze, also bei nahezu der Hälfte, die Hemmungsschwelle für Orchinol bei Konzentrationen von $10^{-3.5}$ bis 10^{-5} molar. Eine durchschnittliche Orchinolkonzentration von $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ molar in den distalen Knollengeweben dürfte deshalb immerhin ausreichen, um dort Neuinfektionen der Knollen zum mindesten durch orchinolempfindliche Mykorrhizenpilze wesentlich zu erschweren.

b) Die Orchinolempfindlichkeit der unspezifischen bodenbewohnenden Pilze

Von den 23 geprüften unspezifischen (d. h. zu *Orchis militaris* in keiner unmittelbaren Beziehung stehenden) bodenbewohnenden Pilzen, von denen ja keiner in den betreffenden Knollengeweben die Orchinolsynthese in Gang zu setzen vermag, sind 19 laut Tabelle 5 orchinolempfindlich; 4 sprechen auf Orchinol nicht an. Einen dieser orchinolunempfindlichen Pilze, nämlich *Ophiobolus graminis*, könnte man sich nach seiner ganzen Lebensform sehr wohl als gelegentlichen Parasiten von Orchideenknollen vorstellen; wenn wir ihn dennoch nie in diesem Zusammenhang angetroffen haben, so liegt dies vielleicht daran, daß *Ophiobolus graminis* in den Knollengeweben von *Orchis militaris* (und wohl auch anderer Orchideen) statt des Mechanismus der Orchinolsynthese (zu dem er den Schlüssel nicht besitzt) einen anderen Abwehrmechanismus in Gang setzt, der offenbar ausreicht, um ihn von den Knollengeweben fernzuhalten.

Das Ausmaß der Orchinolempfindlichkeit bewegt sich bei diesen 19 orchinolempfindlichen bodenbewohnenden Pilzen in derselben Größenord-

nung wie bei den echten Mykorrhizenpilzen der Tabelle 3. Das arithmetische Mittel aus den Zehnerpotenzen der Schwellenwerte beträgt 3,0 für die unspezifischen bodenbewohnenden Pilze der Tabelle 5 und 3,1 für die spezifischen Mykorrhizenpilze der Tabelle 3. Die gewöhnlichen bodenbewohnenden Pilze werden somit, falls sie als Saprophyten oder Folgeparasiten in einen durch einen Mykorrhizenpilz geschaffenen Primärherd eindringen würden, durch die soeben besprochene Orchinol-Immunitätsbarriere in einer ähnlichen Weise aufgehalten wie die echten Mykorrhizenpilze.

c) Die Orchinolempfindlichkeit der bodenbewohnenden Bakterien

Im Gegensatz zu den unspezifischen bodenbewohnenden Pilzen sind die bodenbewohnenden Bakterien (Tab. 6) vorwiegend orchinol unempfindlich; nur bei *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* trat gelegentlich eine zögernde Hemmung auf, die jedoch nicht zuverlässig reproduziert werden konnte und deshalb noch näher auf ihren Charakter hin geprüft werden müßte.

Drei der geprüften Bakterien sind somit orchinolunempfindlich und lösen dennoch in den Knollengeweben von *Orchis militaris* eine reichliche Synthese von Orchinol aus; sie erinnern in dieser Beziehung unter den echten Mykorrhizenpilzen der Tabelle 3 an *Rhizoctonia anomala* Burg. von *Orchis maculata*, die ebenfalls in den Knollen von *Orchis militaris* die Synthese von Orchinol induziert, selbst aber auf diesen Stoff nicht anspricht.

Aus dem vorliegenden Kapitel ergibt sich, daß das Wirkungsspektrum des Orchinols breit und wenig spezifisch ist und fast sämtliche spezifischen und unspezifischen Pilze aus dem Lebensraum der erdbewohnenden Orchideen umfaßt; die wenigen Pilze, die vom Orchinol (man möchte sagen „zufällig") nicht gehemmt werden, sind für die uns hier interessierenden Probleme unwesentlich; sie werden erst von Interesse sein, wenn es gilt, den Mechanismus der Orchinolwirkung zu untersuchen.

Nach der Höhe seiner antifungischen Wirksamkeit muß das Orchinol — verglichen mit den therapeutisch verwendeten Antibiotica der Humanmedizin — als ein schwaches Antibioticum bezeichnet werden; dennoch erfüllt es seine Aufgabe im Rahmen der Infektabwehr der Orchideen vollauf; denn es wird beispielsweise in den unmittelbar bedrohten Knollengeweben in Konzentrationen produziert, die bei den therapeutisch verwendeten Antibiotica niemals in Frage kommen.

Bei den bodenbewohnenden Bakterien, die ja durch Orchinol nicht oder nur sporadisch gehemmt werden und die Knollengewebe z. B. von *Orchis militaris* dennoch nicht überschwemmen, sind in den Wirtsgeweben offenbar andere Abwehrmechanismen wirksam. Wir werden hierauf in einer späteren Arbeit zurückkommen.

5. KAPITEL. ALLGEMEINE BETRACHTUNGEN

Die Besiedlung der Embryonen und der jungen Wurzeln durch echte Mykorrhizenpilze ist für manche Orchideen lebensnotwendig. Es scheint, daß die betreffenden Arten bestimmte Wirkstoffe, z. B. Wuchsstoffe oder Vitamine, nur in ungenügendem Ausmaße synthetisieren und die zusätzlich benötigten Mengen durch Verdauung der eingedrungenen Mykorrhizenpilze gewinnen.

Bei den betreffenden Orchideen bestehen deshalb mikrobiologisch schwierigere Probleme als bei der Mehrzahl der übrigen grünen Pflanzen. Die letzteren halten die Mikroorganismen ihrer Umwelt, insbesondere des schwer kontaminierten Erdbodens, generell als „unerwünscht" von sich fern. Die hier in Frage stehenden Orchideen müssen hingegen, um ihre Entwicklung fortsetzen zu können, zur Mykorrhizenbildung gelangen; sie müssen sich deshalb in bestimmten Organen, nämlich in den jungen Wurzeln und den Embryonen, und nur in diesen beiden Gewebegruppen, selektiv durch bestimmte bodenbewohnende Mikroorganismen, nämlich durch kongeniale Mykorrhizenpilze (und nur durch diese) infizieren lassen und müssen hernach in ihrem Körperinnern mit diesen Eindringlingen zu einem fruchtbringenden biologischen Gleichgewicht gelangen; sie sind deshalb gezwungen, zwischen den Mikroorganismen ihrer Umwelt zu differenzieren.

Je nach dem Verlauf des Parasit-Wirt-Verhältnisses unterscheiden wir vier Fälle:

a) Die Besiedlung der Embryonen und der jungen Wurzeln durch echte Mykorrhizenpilze.

b) Der Befall der Knollen durch echte Mykorrhizenpilze.

c) Die Abwehr unspezifischer bodenbewohnender Pilze durch die unterirdischen Organe der Orchideen.

d) Die Abwehr der saprophytischen bodenbewohnenden Bakterien.

a) Die Besiedlung der Embryonen und der jungen Wurzeln durch echte Mykorrhizenpilze

Die echten Mykorrhizenpilze, deren Infektion im Hinblick auf die spätere Mykorrhizenbildung „erwünscht" ist, verhalten sich auch gegenüber ihren kongenialen Orchideenwirten primär als echte Parasiten; denn sie sind, im Gegensatz zu den übrigen bodenbewohnenden Mikroorganismen, für den Befall von Orchideen spezialisiert und vermögen beispielsweise unmittelbar in unverletzte Wirtsgewebe einzudringen, bei den Embryonen von den Borsten oder von der Ansatzstelle des Suspensors her, bei den jungen Wurzeln durch die unverletzte Epidermis hindurch. In den optimal verlaufenden Fällen wird jedoch ihr Parasitismus postinfektionell durch die Ab-

wehrreaktionen des Wirtes seines malignen Charakters entkleidet und in sein Gegenteil, in eine symbiontische Partnerschaft, verwandelt. Sämtliche spezialisierten Mykorrhizenpilze setzen nämlich in den Wirtsgeweben, was den meisten übrigen bodenbewohnenden Mikroorganismen ebenfalls versagt ist, chemische Abwehrmechanismen in Gang, durch die ihnen ihre eigene Generalisation in den Wirtsgeweben erschwert oder unmöglich gemacht wird.

Diese chemische Infektabwehr ist beispielsweise für die Wurzeln von *Orchis militaris* expressis verbis nachgewiesen worden; die kongenialen Mykorrhizenpilze induzieren nämlich bei dieser Art in den Wurzelgeweben die Synthese z. B. von Orchinol (Gäumann und Kern 1959 a, b). Der durchschnittliche Orchinolgehalt der Wurzeln ist zwar, bezogen auf ihr Gesamtgewicht, sehr niedrig, weniger als 1 % des durchschnittlichen Orchinolgehaltes der infizierten Knollengewebe. Doch ist er offenbar örtlich, z. B. um den Focus herum (analog zur Immunitätsbarriere in den Knollen) erheblich höher; denn er reicht aus, um den Infekt zu lokalisieren und ein Übergreifen auf ältere Wurzelpartien und auf die übrige Pflanze zu verhindern.

Ähnliche Lokalisationsvorgänge spielen sich wahrscheinlich in den jungen Embryonen ab, in denen die eingedrungenen Mykorrhizenpilze von den lebenswichtigen Wachstumsbezirken ferngehalten werden müssen; nur lassen sie sich hier wegen der Kleinheit der Objekte chemisch nicht fassen.

Hand in Hand mit diesem Abdämmen der eingedrungenen Mykorrhizenpilze setzen in den befallenen Zellen und Geweben die von Noël Bernard (1909) klassisch beschriebenen phagozytären und lytischen Prozesse ein, die zur Verdauung der aufgehaltenen Pilzhyphen und zur Selbstreinigung der infizierten Zellen und Gewebe führen (eine Abbildung von Bernard ist bei Gäumann 1951, Abb. 288, wiedergegeben). Bei dieser Verdauung und Selbstreinigung gewinnen offenbar die Wirtsgewebe die zusätzlichen Wirkstoffe, derer sie bedürfen.

Die kongenialen Mykorrhizenpilze und die kongenialen Wirte arbeiten somit im optimalen Falle beim Zustandekommen des biologisch „erwünschten" Gleichgewichtszustandes, der zur Mykorrhizenbildung führt, harmonisch zusammen. Der Mykorrhizenpilz ist und bleibt zwar der potentielle Parasit, als welcher er in die unverletzten Wirtsgewebe einzudringen vermag; anderseits ist er aber auch insofern „privilegiert", als er in bevorzugter Weise in den Wirtsgeweben chemische Abwehrreaktionen, z. B. die Synthese von Orchinol, auslöst, durch die er (im optimalen Falle) innerhalb fruchtbringender Grenzen gehalten wird: er darf einerseits nicht vorzeitig abgeriegelt werden, da sonst — wie sich bei der Samenkeimung leicht beobachten läßt — die Infektion (im Sinne des Mykorrhizeneffektes) wirkungslos bliebe, und anderseits darf er, wie sich ebenfalls bei der Samenkeimung verfolgen läßt, auch nicht übermächtig, d. h. nicht einseitig parasitisch werden und die Wirtsgewebe abtöten, sondern das Parasit-Wirt-Verhältnis muß in einer harmonischen Lebensgemeinschaft, eben im Mykorrhizenverhältnis, ausmünden.

Dieses labile Spiel und Gegenspiel der Kräfte dauert in den jungen Embryonen und den jungen Wurzeln eine gewisse Zeit an, bis sich die alternden Wirtsgewebe ihres Mykorrhizenpartners, der offenbar nunmehr seine biologische Funktion erfüllt hat, endgültig entledigen.

b) Der Befall der Knollen durch echte Mykorrhizenpilze

Die für den Befall von intakten Orchideengeweben spezialisierten Mykorrhizenpilze machen naturgemäß vor den Knollen nicht halt, deren zarte Rinde sie ja ohne weiteres zu durchbohren vermögen. Trotz dieser leichten Zugänglichkeit erweisen sich jedoch die im Laufe des Sommers heranwachsenden jungen (diesjährigen) Knollen im Freiland nur selten als infiziert. Diese relative Seltenheit der Knolleninfektionen bildete ja seinerzeit den Ausgangspunkt unseres Arbeitszyklus: Warum sind bei gewissen Orchideen die Wurzeln regelmäßig von Mykorrhizenpilzen besiedelt und warum im selben Lebensraum die Knollen fast nie?

Heute wissen wir, daß diese Frage nicht ganz richtig gestellt war. Die diesjährigen Knollen sind nämlich nur während der Vegetationszeit in der Regel befallsfrei, d. h. nur während der Monate, da man sie im Freien auffinden und untersuchen kann. Verpflanzt man sie dagegen, wie in unserem Falle, in Triebbeete, wo sie auch nach dem Einziehen der Blätter der Beobachtung zugänglich bleiben, so erweisen sie sich beispielsweise bei *Orchis militaris*, weniger bei *Loroglossum hircinum*, vor allem gegen das Frühjahr hin recht häufig als von Mykorrhizenpilzen infiziert; diese haben somit im Laufe des Spätsommers den Weg zu ihnen gefunden und betreten.

Für die Knollen sind diese Infektionen durch Mykorrhizenpilze — im Gegensatz zur Besiedlung der Embryonen und der jungen Wurzeln — vollkommen „unerwünscht", da sie nicht zu einer Mykorrhizenbildung, sondern höchstens zu einem Fäulnisprozeß führen. Doch finden sich maligne Generalisationen, die in Fäulnisprozessen enden, in den Knollen nur selten; die Infektionsstellen (erkennbar an der schwarzbraunen Verfärbung der Gewebe) bleiben vielmehr normalerweise auf kleine Herde beschränkt. Die Fragestellung muß deshalb heute lauten: Wie kommt diese Lokalisation der Infektionsherde in den Knollen zustande?

Antwort: Die Lokalisierung der eingedrungenen Mykorrhizenpilze erfolgt durch kräftige, von ihnen selbst in den Knollengeweben induzierte chemische Abwehrreaktionen; diese nehmen ein derartiges Ausmaß an, daß am Focus fast der gesamte Stoffwechsel auf Infektabwehr umgestellt wird, und es entsteht innerhalb weniger Tage um ihn herum eine Immunitätsbarriere, in der der Gehalt an Orchinol (abgesehen von den übrigen induzierten Abwehrstoffen) schon allein ausreicht, um sämtliche in Betracht fallenden Mykorrhizenpilze aufzuhalten und am Übergreifen auf die intakt

gebliebenen Knollengewebe zu verhindern; durch diese Immunitätsbarriere wird der Infektionsherd abgekapselt. Die Lokalisierung der in den Knollen durch Mykorrhizenpilze geschaffenen Infektionsherde kommt somit dadurch zustande, daß die spezialisierten Erreger rund um den Focus die Bildung einer wirkungsvollen Gewebeimmunität induzieren.

Über diese örtliche Schutzwirkung hinaus aktivieren sie jedoch die chemische Infektabwehr auch in den übrigen Knollengeweben. Der Orchinolspiegel bleibt zwar dort etwa zehnmal niedriger als am Focus; doch steigt er hoch genug, um weitab vom Focus eine Reinfektion der Knollen durch dieselben oder durch ähnliche Mykorrhizenpilze zum mindesten stark zu erschweren. Dadurch entsteht in der gesamten Knolle eine Organimmunität.

Und da anderseits der erhöhte Orchinolspiegel monatelang in den Knollengeweben persistiert, so wirkt er auch dann nach, wenn der Primärherd erloschen sein sollte; die in den Knollengeweben einmal ablaufenden chemischen Abwehrreaktionen schützen sie deshalb nicht nur gegen die bestehende Infektion, sondern sie feien sie auch gegen künftige Reinfektionen durch dieselben oder durch ähnliche Mykorrhizenpilze. Sie schaffen dadurch in den Knollengeweben eine echte Immunität.

c) Das Fernhalten der unspezifischen bodenbewohnenden Pilze

Während die kongenialen Mykorrhizenpilze und die kongenialen Orchideen in ihrem Stoffwechsel derart aufeinander abgestimmt sind, daß die ersteren in den letzteren spezielle Synthesen in Gang zu setzen vermögen, stehen die gewöhnlichen saprophytischen und halbparasitischen bodenbewohnenden Pilze, drastisch ausgedrückt, zu den Orchideen überhaupt in keinem Verhältnis: die Mykorrhizenpilze besitzen ein spezifisches Infektionsvermögen für Orchideen; die unspezifischen bodenbewohnenden Pilze sind dagegen normalerweise überhaupt nicht imstande, in unverletzte Orchideengewebe einzudringen. Sämtliche Mykorrhizenpilze, die für den Befall der hier als Modellbeispiel gewählten *Orchis militaris* in Betracht kommen, greifen entscheidend in den Stoffwechsel ihres Wirtes ein und steuern ihn um auf Infektabwehr, so auf die Synthese von Orchinol; von den unspezifischen bodenbewohnenden Pilzen ist hingegen kein einziger imstande, in den *Orchis-militaris*-Geweben die Orchinolsynthese auszulösen; einige wenige von ihnen, laut Tabelle 5 drei von 24 geprüften Arten, besitzen immerhin den Schlüssel, um in den Geweben von *Orchis militaris* einen anderen chemischen Abwehrmechanismus (zu dessen Induktion die Mykorrhizenpilze ebenfalls imstande sind) in Gang zu setzen. Die Orchideen und die gewöhnlichen saprophytischen und halbparasitischen Pilze des Erdbodens leben deshalb beziehungslos nebeneinander her.

Selbst dann, wenn in den Knollen durch Tierfraß oder durch das Absterben von Wurzeln Wunden entstehen, werden diese von den unspezifischen, bodenbewohnenden Pilzen nur selten als Eingangspforte benützt; wir haben in den Knollen von *Orchis militaris* nur ausnahmsweise Pilz-

kontaminationen beobachtet, am ehesten noch durch Fusarien. Dieser geringe Wundbefall steht vielleicht mit der unspezifischen Orchinolsynthese im Zusammenhang, die in unverletzten Knollengeweben mit der Zeit — unabhängig von jeglicher mikrobiellen Einwirkung — einsetzen kann; dieses „unspezifische" Wundorchinol würde dann (da die gewöhnlichen bodenbewohnenden Pilze für Orchinol ungefähr im gleichen Ausmaße empfindlich sind wie die echten Mykorrhizenpilze) gewissermaßen als chemische Barriere die Wundstellen abriegeln.

Der direkte Weg der Primärinfektion in die Orchideengewebe ist somit den unspezifischen bodenbewohnenden Pilzen in jeder Hinsicht versagt. Anderseits ist ihnen aber auch die Möglichkeit verschlossen, als Sekundärparasiten oder als gewöhnliche Saprophyten dem Infektionsweg der spezialisierten Mykorrhizenpilze zu folgen; die Ursachen liegen bei den Embryonen, den Wurzeln und den Knollen auf ähnlicher Ebene.

Für keimende Samen ist schon von NOËL BERNARD (1909) das Bestehen einer P r ä m u n i t ä t nachgewiesen worden. Werden junge Embryonen mit einem wenig aggressiven Mykorrhizenstamm infiziert, so dringen die Hyphen an der Ansatzstelle des Suspensors einige Zellagen tief ein und werden dann abgeriegelt. Setzt man diese präinfizierten Embryonen einige Tage später einem agressiven Pilzstamm aus, der derart agressiv ist, daß er normalerweise die Keimlinge abtöten würde, so ist es ihm nicht mehr möglich, die genannte Eingangspforte zu benützen; die neue Infektion kommt also nicht mehr zum Haften (GÄUMANN 1951, S. 414). Durch diese Abwehrreaktionen der Keimlingsgewebe werden aber zweifelsohne nicht nur die neu heranwachsenden Mykorrhizenpilze ferngehalten, sondern wohl ebensosehr die übrigen bodenbewohnenden Pilze, die ja beispielsweise auf Orchinol im gleichen Ausmaß ansprechen wie die echten Mykorrhizenpilze.

Für die Wurzeln ist das Bestehen einer derartigen préséance noch nicht nachgewiesen; doch ist sie wahrscheinlich, da wir bei der Isolierung von Mykorrhizenpilzen aus dem Innern junger Wurzelgewebe nur selten Fremdinfektionen feststellten.

Auch in den Knollen können die unspezifischen bodenbewohnenden Pilze die von den echten Mykorrhizenpilzen geschaffenen Primärherde nicht als Eintrittspforte benützen; denn die im vorangehenden Abschnitt besprochene Immunitätsbarriere riegelt nicht nur den Primärerreger, der ihre Entstehung auslöste, ab, sondern als Nebenwirkung ebensosehr auch die Folgeparasiten und Saprophyten, die ja fast ausnahmslos orchinolempfindlich sind.

Wenn also die unterirdischen Organe unserer Orchideen normalerweise von den unspezifischen bodenbewohnenden Pilzen nicht befallen werden und deshalb auch in hochkontaminierten Böden nur selten faulen, so beruht dies nicht auf einer gezielt gegen sie gerichteten Infektabwehr (denn sie lösen in der Regel keine chemischen Abwehrreaktionen aus), sondern auf dem Zusammenwirken günstiger Umstände. Einmal ist ihre parasitische „Begabung"

derart unbedeutend, daß sie nicht einmal die zarten Rindengewebe der Knollen perforieren und deshalb, trotz des geringen mechanischen Infektionsschutzes, nicht als Primärerreger in intakte Gewebe eindringen können. Und wenn ihnen anderseits die spezialisierten Mykorrhizenpilze einen Infektionsweg öffnen, so vermögen sie ihn nicht zu benützen, weil sie auf die Abwehrstoffe, deren Bildung durch die spezialisierten Primärerreger ausgelöst wurde, so empfindlich sind wie diese selbst.

Der direkte Weg in das Innere des Wirtes ist somit den unspezifischen bodenbewohnenden Pilzen wegen ihrer geringen parasitischen Begabung versagt, und der indirekte Weg als Folgeparasiten der Primärerreger ist für sie nicht begehbar wegen ihrer Empfindlichkeit für die von den Primärerregern induzierten und deshalb gar nicht in erster Linie gegen die Folgeparasiten gerichteten Abwehrstoffe.

d) Die Abwehr der saprophytischen bodenbewohnenden Bakterien

Die saprophytischen bodenbewohnenden Bakterien sind, wie die unspezifischen bodenbewohnenden Pilze, auf Wunden als Eingangspforten in die Orchideengewebe angewiesen. In mykorrhizentragenden Wurzeln könnten sie beispielsweise dem Infektionsweg der Mykorrhizenpilze folgen oder durch absterbende Mykorrhizenpartien in die Wurzeln eindringen; dennoch sind sie uns in mykorrhizentragenden Wurzeln nur selten begegnet. Auch für Embryonen werden sie nicht angegeben.

Desgleichen werden die Knollengewebe nur selten von Bakterien überschwemmt. Einen Grenzfall bilden *Erwinia carnegieana, Erwinia nimipressuralis* und *Pseudomonas putida*, die zum mindesten bei *Orchis militaris* und bei *Loroglossum hircinum* häufig die peripheren Gewebeschichten der Knollen besiedeln, jedoch streng auf diese peripheren Bezirke beschränkt sind. Sie induzieren zwar, im Gegensatz zu den übrigen saprophytischen Bakterien des Erdbodens, in den Knollen von *Orchis militaris* die Synthese von Orchinol; doch kommt diesem Vorgang biologisch wohl kaum ein tieferer Sinn zu, da sie auf Orchinol selbst nicht ansprechen.

Auf Grund unserer heutigen Kenntnisse vermögen wir somit die Infektabwehr der Orchideen gegenüber den bodenbewohnenden Bakterien nicht zu erklären. Der Fragenkomplex muß deshalb noch näher untersucht werden.

Zusammenfassung

1. Sämtliche 24 geprüften mittel- und südeuropäischen erdbewohnenden Orchideen sind zu chemischen antiinfektionellen Abwehrreaktionen gegenüber ihren Mykorrhizenpilzen befähigt; das Phänomen der chemischen Infektabwehr ist somit bei ihnen eine Allgemeinerscheinung. 16 dieser 24 Arten synthetisieren als Abwehrstoff das Orchinol; andere Arten bilden andere, noch unbekannte Abwehrstoffe. Doch sind einige Vertreter, z. B. *Orchis militaris*, imstande, neben dem Orchinol noch mit einem zweiten (unbekann-

ten) Abwehrstoff zu antworten. Eine Beziehung zwischen der Fähigkeit zur Orchinolsynthese und der systematischen Stellung der betreffenden Orchideen scheint nicht zu bestehen.

2. Von 19 geprüften, aus mittel- und südeuropäischen erdbewohnenden Orchideen isolierten Mykorrhizenpilzen vermögen alle ausnahmslos bei *Orchis militaris* einen Mechanismus der chemischen Infektabwehr, in der Regel die Bildung von Orchinol, in Gang zu setzen; ihr Stoffwechsel muß somit in besonderer Weise auf denjenigen der Wirtsgewebe abgestimmt sein. Umgekehrt ist von 24 „unspezifischen", d. h. willkürlich ausgewählten saprophytischen oder halbparasitischen Pilzen des Erdbodens keiner imstande, in den Geweben von *Orchis militaris* die Orchinolsynthese auszulösen; trotz dieser Beschränkung auf die Mykorrhizenpartner bildet die Fähigkeit, in den Wirtsgeweben die Orchinolsynthese zu induzieren, nicht ein ausschließliches Privileg der Mykorrhizenpilze; denn auch drei bodenbewohnende Bakterien, die häufig in den peripheren Gewebeschichten der *Orchis militaris*-Knollen vorkommen und selbst auf Orchinol nicht ansprechen, sind hierzu imstande.

3. Das Wirkungsspektrum des Orchinols ist breit und wenig spezifisch; es umfaßt die überwiegende Mehrzahl der 19 geprüften Mykorrhizenpilze und der 24 gewöhnlichen bodenbewohnenden Pilze; hingegen werden die bodenbewohnenden Bakterien in der Regel durch Orchinol nicht gehemmt. Nach der Höhe seiner antifungischen Wirksamkeit muß das Orchinol — verglichen mit den therapeutisch verwendeten Antibiotica der Humanmedizin — als ein s c h w a c h e s Antibioticum bezeichnet werden; dennoch erfüllt es seine Aufgabe im Rahmen der Infektabwehr der Orchideen vollauf; denn es wird beispielsweise in den unmittelbar bedrohten Knollengeweben in Konzentrationen produziert, die bei den therapeutisch verwendeten Antibiotica niemals in Frage kommen.

4. Bei den auf Mykorrhizenbildung angewiesenen Orchideen bestehen mikrobiologisch besondere Probleme; denn sie müssen sich in bestimmten Organen, nämlich in den Embryonen und den jungen Wurzeln, selektiv durch bestimmte bodenbewohnende Mikroorganismen, nämlich durch kongeniale Mykorrhizenpilze (und nur durch diese) infizieren lassen und müssen hernach in ihrem Körperinnern mit diesen Eindringlingen zu einem fruchtbringenden biologischen Gleichgewicht gelangen; in den Knollen ist hingegen jegliche Infektion, sei es durch Mykorrhizenpilze oder durch unspezifische bodenbewohnende Pilze und Bakterien, „unerwünscht". Es wird versucht, das bei dieser differenzierten Infektabwehr abrollende Zusammenspiel der Kräfte einigermaßen zu deuten.

Summary

1. All the 24 central- and south-european orchids tested are capable of chemical anti-infectional defence reactions against their mycorrhiza fungi. Thus, chemical infect-defence is a phenomenon common to all of them. 16 of these 24 species synthesize orchinol as a defensive substance. Some

of them, however, e. g. *Orchis militaris*, are capable of responding with a second (unknown) defensive substance. Other species produce other substances which are not yet known. There seems to exist no relation between the capacity for orchinol synthesis and the position of these orchids in the system.

2. All the 19 mycorrhiza fungi isolated from central- and south-european soil-inhabiting orchids can start a mechanism of chemical infect-defence, as a rule the synthesis of orchinol. Thus their metabolism must in a special way be in tune with the metabolism of the host-tissue. On the other hand, of 24 saprophytic or semiparasitic soil-fungi, which, being chosen at random, may be termed "unspecific", none is capable of inducing an orchinol synthesis in the tissues of *Orchis militaris*. In spite of this limitation to the mycorrhiza-partners among the fungi, the capacity for starting an orchinol synthesis in the tissues of the host is not an exclusive privilege of mycorrhiza fungi. Three soil-inhabiting bacteria, which often occur in the peripheric tissue layers of *Orchis militaris* bulbs, can also provoke its synthesis in the tissues.

3. The spectrum of antibiotic action of orchinol is broad and hardly specific. It covers the great majority of the 19 mycorrhiza fungi tested and of the 24 ordinary soil-inhabiting fungi. Soil-inhabiting bacteria, on the other hand, are normally not affected by orchinol. Judged by its antifungal efficacity, orchinol must be termed a weak antibiotic in comparison with the antibiotics used in human medicine. Nevertheless, it entirely fulfils its task within the defensive system of the orchids; in bulb tissues immediately threatened, for instance, it is produced in concentrations as never occur in antibiotics employed in medical therapy.

4. The orchids which depend on the mycorrhiza formation face special microbiological problems. They must permit a selective infection of certain organs, viz. embryos and young roots, by certain soil-inhabiting micro-organisms, viz. congenial mycorrhiza fungi (and only by these). Afterwards they must attain in their tissues a fruitful biological equilibrium with these intruders. Any infection of the bulbs, however, be it by mycorrhiza fungi or by unspecific, soil-inhabiting fungi or bacteria, is "undesirable". A tentative interpretation of the concert of forces in this differenciated infect-defence is given.

Literaturverzeichnis

Bernard, N., 1909: L'évolution dans la symbiose. Les orchidées et leurs champignons commensaux. Ann. sc. nat., Bot., 9. Sér., **9**, 1—196.

Burgeff, H., 1936: Samenkeimung der Orchideen. Jena, 312 S.

Downie, D. G., 1959 a: *Rhizoctonia solani* and orchid seed. Transact. and Proc. Bot. Soc. Edinburgh **37**, 279—285.

— —, 1959 b: The mycorrhiza of *Orchis purpurella*. Transact. Bot. Soc. Edinburgh **38**, 16—29.

Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Birkhäuser, Basel, 681 S.

— —, R. Braun und G. Bazzigher, 1950: Über induzierte Abwehrreaktionen bei Orchideen. Phytopath. Z. **17**, 36—62.

— —, und H. R. Hohl, 1960: Weitere Untersuchungen über die chemischen Abwehrreaktionen der Orchideen. Phytopath. Z. **38**, 93—104.

— —, und H. Kern, 1959 a: Über die Isolierung und den chemischen Nachweis des Orchinols. Phytopath. Z. **35**, 347—356.

— —, und — —, 1959 b: Über chemische Abwehrreaktionen bei Orchideen. Phytopath. Z. **36**, 1—26.

Hughes, S. J., 1951: Studies on micro-fungi, IX. *Calcarisporium, Verticicladium,* and *Hansfordia* (gen. nov.). Commonw. Myc. Inst., Kew, Myc. Pap. **43**, 1—25.

Kusano, S., 1911: *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea.* J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo **4**, 1—66.

Nobécourt, P., 1928: Contribution à l'étude de l'immunité chez les végétaux. Tunis, 176 S.

Aus dem Forstbotanischen Institut Tharandt der Technischen Hochschule Dresden

Institutsdirektor: Prof. Dr. H. Jahnel

Beiträge zur Fluorschadendiagnostik

I. Fluorschaden-Weiserpflanzen in der Wildflora

Von

W. Borsdorf

Inhalt: Einleitung. — Methode. — Differentialdiagnose. — Ergänzende Untersuchungen. — Ergebnisse. — Empfindlichkeitsgruppen. — Beziehungen zwischen Schadbild und Umweltverhältnissen. — Beziehungen zwischen Schadbild und (Fremd-) Fluorgehalt. — Beziehungen zwischen Schadbild und Jahreszeit. — Verwertbarkeit der Ergebnisse. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

EINLEITUNG

In den Jahren 1957 bis 1959 wurde die Flora in der Umgebung eines Fluorgase emittierenden Werkes in Mitteldeutschland daraufhin überprüft, inwieweit die mit bloßem Auge sichtbaren Schadbilder Rückschlüsse auf Intensität und Reichweite der Abgase gestatten.

Als Schaderreger kommt im wesentlichen Flußsäure in Frage. Außerdem entweichen in die nächste Werksumgebung Kryolithstäube, deren Schadwirkung zwar noch näher zu untersuchen bleibt, aber jedenfalls wesentlich derjenigen der Flußsäure nachsteht.

1. Methode

Um eine möglichst große Anzahl wildwachsender Arten erfassen zu können, wurde die mikrochemische Untersuchung des geschädigten Materials auf Stichproben beschränkt und statt dessen versucht, die Ergebnisse durch häufige Kontrollen in 3 Vegetationsperioden und durch Vergleichsuntersuchungen im Gebiet zweier weiterer mitteldeutscher Betriebe mit flußsäurehaltigen Abgasen zu sichern. In Auswertung der ersten Beobachtungen von 1957 wurden, dem Wegenetz angepaßt, drei das Werkgelände berührende Routen in Richtung W—E, SW—NE und NW—SE (—S) festgelegt, im Jahre 1958 im Mai, Juni und August jeweils an drei einander naheliegenden Tagen systematisch abgegangen und 1959 nochmals in zwei Durchgängen kontrolliert.

Die stärksten Schäden treten in enger Nachbarschaft des Werkes auf, da die Abgase in geringer Höhe entweichen. Die in Werknähe stark betroffenen Arten wurden bis zum völligen Erblassen der Schadbilder in etwa

3 km Entfernung verfolgt. Mit Hilfe von Symbolen wurden die Befunde (Schadstärke und Schadbild) von 115 Pflanzenarten — darunter auch einigen angebauten — in knapp 900 Einzelbeobachtungen notiert. Die aus der Literatur (z. B. BREDEMANN 1956, BENEDICT und BREEN 1955, BURSCHE 1955 S. 44) bekannten Blattrand- und Blattspitzennekrosen herrschen auch hier vor; Nekrosen der Interkostalfelder sind seltener.

2. Differentialdiagnose

Im Untersuchungsgebiet sind gleichzeitig in geringem Maße Schäden durch Schwefeldioxyd vom Werk selbst, einer nahen Fabrik und einem etwa 3 km nördlich gelegenen Industriezentrum denkbar. Obwohl für Fluor- und Schwefeldioxyd-Schäden allgemein unterschiedliche Symptome beschrieben werden (vgl. z. B. die oben zitierte Literatur), wurde zur Vorsicht auch die Umgebung des Industriezentrums überprüft. Es zeigten sich k e i n e mit typischen Fluorschäden verwechselbaren Schadbilder.

Schwieriger ist in einigen Fällen, besonders bei Gräsern, die Abgrenzung von schwachen Fluor- gegen Trockenschäden (s. u. 4 b Absatz e).

Die von BURSCHE (1955, S. 48 ff.) mitgeteilten mikroskopischen Unterscheidungsmerkmale konnten bisher noch nicht auf ihre Anwendbarkeit bei Gräsern erprobt werden. Grundsätzlich sind daher alle beobachteten Zweifelsfälle vorerst von der Auswertung ausgeschlossen worden.

Inwieweit Komplexwirkungen zwischen Fluorabgasen und weiteren Schadfaktoren vorliegen können, ist uns gegenwärtig noch unbekannt, doch muß mit dieser Möglichkeit stets gerechnet werden.

3. Ergänzende Untersuchungen

Eigene mikroskopische Untersuchungen beschränkten sich vorerst auf vermutete Ätzschäden am Kieselgerüst der stark fluorempfindlichen Knaulgrasblätter (*Dactylis glomerata* L.), doch waren eindeutige Unterschiede gegenüber den ungeschädigten Kontrollblättern nicht zu finden.

Um Anhaltspunkte über die Beziehungen zwischen Stärke des äußerlich sichtbaren Schadens und dem Fluorgehalt zu gewinnen, wurden ungewaschene Blätter einiger Arten stichprobenartig an der Luft vor- und im Trockenschrank bei etwa 60 °C nachgetrocknet, im Mörser zerrieben und mikrochemisch auf Fluor untersucht[1]). Das Verfahren (nach BREDEMANN und RADELOFF 1932) ist hinreichend grob, um den natürlichen Fluorspiegel der Pflanzen unberücksichtigt zu lassen.

4. Ergebnisse

a) Empfindlichkeitsgruppen

In Auswertung der Tabellenarbeit wurden die im Gebiet häufigeren Arten vorläufig 4 Fluor-Empfindlichkeitsgruppen zugeteilt. Im folgenden

[1]) Für die Durchführung der Analysen sei Herrn Dipl.-Chem. HERMANN (Inst. f. Forstschutz) auch an dieser Stelle gedankt.

werden hiervon nur solche Arten genannt, deren Zuordnung mindestens durch zweijährige Beobachtung im Hauptuntersuchungsgebiet oder Beobachtungen im Raume eines der beiden Vergleichsgebiete gesichert erscheint. Die Kulturpflanzen sind mit aufgenommen (cult.), Gehölze durch * gekennzeichnet. Die Reihenfolge innerhalb der Gruppen deutet im allgemeinen nicht auf feinere Empfindlichkeitsabstufungen.

A. Hochempfindlich
- * Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), cult.
- * Hainbuche (*Carpinus betulus* L.)
- Schwertlilie (*Iris germanica* L.), cult.
- Knaulgras (*Dactylis glomerata* L.)
- Glatthafer (*Arrhenatherum elatius* [L.] J. u. C. Presl)

B. Empfindlich
- * Spitzahorn (*Acer platanoides* L.)*)
- * Bergahorn (*Acer pseudoplatanus* L.)*)
- * Jungfernrebe (*Parthenocissus quinquefolia* [L.] Planch. u. *P. tricuspidata* Planch.), cult.
- Sauerampfer (*Rumex acetosa* L.)
- Rhabarber (*Rheum rhabarbarum* L.), cult.
- * Hauspflaume (*Prunus domestica* L.)
- Deutsches Weidelgras (*Lolium perenne* L.)
- Wiesenschwingel (*Festuca pratensis* Huds.)
- Wiesenfuchsschwanz (*Alopecurus pratensis* L.)
- Wiesenrispe (*Poa pratensis* L.)
- Hopfen (*Humulus lupulus* L.)
- Luzerne (*Medicago sativa* L.)
- Ackerwinde (*Convolvulus arvensis* L.)
- Kanten-Hartheu (*Hypericum maculatum* Cr.)
- (noch ungenügend gesichert: *Hypericum perforatum* L.)

C. Wenig empfindlich
- * Schwarzer Holunder (*Sambucus nigra* L.)
- * Warzenbirke (*Betula pendula* Roth)
- * Stieleiche (*Quercus robur* L.)
- * Traubeneiche (*Quercus petraea* [Matt.] Lieblein)
- * Schwarzer Holunder (*Sambucus nigra* L.)
- * Weißdorn (*Crataegus oxyacantha* L. u. *C. monogyna* Jacq.)
- Steifhaarige Rauke (*Sisymbrium loeselii* Juslen.)
- Wiesen-Flockenblume (*Centaurea jacea* L.)
- Weißer Gänsefuß (*Chenopodium album* L.)
- Mittlerer Wegerich (*Plantago media* L.)
- Spitzwegerich (*Plantago lanceolata* L.)

*) Dabei Spitzahorn deutlich empfindlicher als Bergahorn.

D. Unempfindlich

* Pfaffenhütchen (*Evonymus europaea* L.)
* Kreuzdorn (*Rhamnus cathartica* L.)
Weiße Taubnessel (*Lamium album* L.)
Rote Taubnessel (*Lamium purpureum* L.)
Wiesensalbei (*Salvia pratensis* L.)
Genfer Günzel (*Ajuga genevensis* L.)
Natternkopf (*Echium vulgare* L.)
Schöllkraut (*Chelidonium majus* L.)
Wiesenlabkraut (*Galium mollugo* L.)
Kriechendes Fingerkraut (*Potentilla reptans* L.)
Große Fetthenne (*Sedum maximum* Hoffm.)
Große Brennessel (*Urtica dioica* L.)
Ackerstiefmütterchen (*Viola tricolor* L.)
Löwenzahn (*Taraxacum officinale* Web.)
Grind-Flockenblume (*Centaurea scabiosa* L.)
Rainfarn (*Chrysanthemum vulgare* [L.] Bernh.)
Ackerdistel (*Cirsium arvense* [L.] Scop.)
Eselsdistel (*Onopordum acanthium* L.)
Wermut (*Artemisia absinthium* L.)
Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.)
Saatwicke (*Vicia sativa* ssp. *angustifolia* [L.] Gaud.)
Weißklee (*Trifolium repens* L.)
Kronwicke (*Coronilla varia* L.)
Weißer Steinklee (*Melilotus albus* Med.)
Pfeilkresse (*Cardaria draba* [L.] Desv.)
Lackschöterich (*Erysimum cheiranthoides* L.)
Feldkresse (*Lepidium campestre* [L.] R. Br.)
Barbarakraut (*Barbarea vulgaris* R. Br.)
Nachtviole (*Hesperis matronalis* L.) verwildert

Von den im Gebiete stark vertretenen größeren Pflanzenfamilien scheinen, wie Einzelbeobachtungen an zahlreichen weiteren Arten noch unterstreichen, die Gramineen und Polygonaceen allgemein recht empfindlich, die Labiaten, Kompositen, Papilionaceen, Kruziferen und Umbelliferen dagegen sehr widerstandsfähig. Über diese sippensystematischen Besonderheiten hinaus scheinen u. a. Beziehungen zwischen Fluorempfindlichkeit und Eigensäuregehalt der Blätter zu bestehen.

Bei der heutigen Kapazität und Produktionsweise zeigen z. B. die Arten der Gruppe A im Hauptuntersuchungsgebiet deutliche Schäden in bevorzugten Windrichtungen noch über 1 km (vereinzelt 2 bis 3 km) Entfernung; in unmittelbarer Werknähe sind die Arten stark geschädigt. Arten der Gruppe D sind selbst an besonders abgasexponierten Stellen und im Werksgelände nicht oder nur schwach und vereinzelt geschädigt. Während sich innerhalb A und B noch feinere Abstufungen herausarbeiten ließen, ist die Abgrenzung zwischen C und D weniger scharf.

b) Beziehungen zwischen Schadbild und Umweltverhältnissen

Solange die Ergebnisse der Geländebeobachtung nicht durch einwandfreie, d. h. den natürlichen Bedingungen nahe Laborversuche ergänzt werden können, ist eine genauere Definition der Empfindlichkeitsgruppen nicht möglich, da die Schadstärke durch folgende Faktoren modifiziert wird:

a) Geländeausformung (stärkere Schäden an Prallhängen, entlang unbewaldeter sanfter Mulden und in windgeschützten Taleinschnitten; geringere Schäden an Hängen, die der Zugrichtung der Gase abgewandt sind).

b) Windrichtung (deutliche Unterschiede zwischen 1957 mit häufigen Ostwinden und 1958 mit normal vorherrschenden Westwinden).

c) Bewaldung — ein Teil der Abgase wird offenbar von der Baumschicht zurückgehalten, so daß dann die Bodenflora weithin ungeschädigt bleibt.

d) Wegen des häufigen Zusammenbleibens der stark hygroskopischen Fluorabgase (häufig sichtbar als Wölkchen) läßt sich besonders in Werknähe oft stark wechselnde Schadintensität auf wenige Meter Entfernung beobachten. Dieser Umstand erschwert bei geringer Beobachtungsdichte das Ausarbeiten von Resistenzreihen und dürfte ein wesentlicher Grund für einige Resultate sein, die von kurzfristigen Wahrnehmungen Bredemanns (1956, S. 159) abweichen.

e) Die extreme Regenarmut der Vegetationsperiode 1959 lehrt, daß Trockenheit entgegen den Vermutungen von Miller, Johnson und Allmendinger (1948) offenbar die Schadintensität nicht merklich erhöht, sondern sie anscheinend etwas senkt. Dies würde mit der schadenfördernden Wirkung starken Taufalls, wie sie immer wieder von Ortseinwohnern betont wird, und mit Laborergebnissen von Benedict und Breen (1955, S. 188) gut übereinstimmen. Hingegen sind Dürreschäden besonders an Monokotylen, wo Spitzennekrosen vorherrschen, makroskopisch nicht immer sicher von schwachen Fluorschäden unterscheidbar.

c) Beziehungen zwischen Schadbild und (Fremd-) Fluorgehalt

Die stichprobenartigen mikrochemischen Untersuchungen zeigten, daß der Fluorgehalt ungewaschener Proben bei gleichweit vom Werk entfernten Arten n i c h t in Beziehung zum Schadbild steht. So erreichten z. B. sowohl äußerlich völlig ungeschädigte Blätter von *Rhamnus cathartica* L. als auch stark rand- und spitzengeschädigte Blätter von *Malus silvestris* (L.) Mill. aus Gebieten starker Immission beide nach der Mühlsteph-Skala den Wert 4 und darüber (äußerst starke Fluor-Reaktion). Daher dürfen u. a. als „resistent" erkannte Pflanzenarten nicht bedenkenlos verfüttert werden.

d) Beziehungen zwischen Schadbild und Jahreszeit

sind schwer exakt zu fassen, da die wechselnden Windverhältnisse, besondere Wetterlagen mit starker Taubildung wie auch plötzliche Defekte im Produktionsablauf des Werkes und daraus folgende kurzfristig verstärkte Abgas-Emission den kontinuierlichen Ablauf zu stark beeinflussen. Entgegen anderen

Meinungen können aber die Beobachtungen von DE ONG (1946) und die Laborergebnisse von BENEDICT und BREEN (1955, S. 180) bestätigt werden, wonach junge Blätter offenbar weniger empfindlich sind als ausgewachsene. Dies gilt auch für die hochsommerlichen Zweitaustriebe der Gräser, doch bleibt vorläufig in allen Fällen offen, inwieweit schon allein die unterschiedliche Einwirkungsdauer diesen Eindruck hervorbringt.

5. Verwertbarkeit der Ergebnisse

Zusammenfassend darf gefolgert werden, daß die Verwendung von wildwachsenden Fluorschadenweiserpflanzen ein diagnostisches Hilfsmittel sein kann, solange man den Blick für den modifizierenden Einfluß der Umweltbedingungen wach hält. Der Rauchschadendiagnostiker wird ohnehin kein Patentrezept erwarten, weil auch das pathologische Geschehen in der Natur viel zu mannigfaltig ist, als daß es sich in Formeln und Schemata pressen ließe.

Zusammenfassung

In einem von fluorhaltigen Abgasen betroffenen Gebiete Mitteldeutschlands wurden die Wildflora und einige Kulturpflanzen auf ihre Verwendbarkeit als Weiser für Reichweite und Intensität von Fluorschäden untersucht.

Als Ergebnis dreijähriger Beobachtungen wird eine Liste von 59 Arten mitgeteilt, wobei auf Grund des makroskopischen Schadbildes (Nekrosen an Blattspitzen und -rändern, weniger häufig in den Interkostalfeldern) 4 Empfindlichkeitsgruppen unterschieden sind. Als hochempfindlich erwiesen sich *Vitis vinifera* L., *Carpinus betulus* L., *Iris germanica* L., *Arrhenatherum elatius* (L.) J. u. C. Presl und *Dactylis glomerata* L. Allgemein scheinen die Arten der Gramineen und Polygonaceen empfindlich, die der Labiaten, Kompositen, Papilionaceen, Kruziferen und Umbelliferen dagegen sehr widerstandsfähig zu sein.

Die Schadbildstärke wird u. a. durch mehrere Umweltfaktoren (Geländeausformung, vorherrschende Windrichtung, Niederschläge, Bewaldungsgrad) beeinflußt.

Summary

Contributions on the diagnosis of fluorine damage
I. Fluorine damage in indicator plants in the wild flora.

In an area of Central Germany affected by gaseous waste containing fluorine, the wild flora and some cultivated plants were investigated as to their suitability as indicators of the degree and intensity of the noxious effects of the fluorine.

As a result of three years of observation a list of 59 species is presented, four susceptibility groups being distinguished on the basis of the macroscopic symptoms of the damage (necrosis on the leaf tips and margins, less fre-

quently in the zones between the ribs). *Vitis vinifera* L., *Carpinus betula* L., *Iris germanica* L., *Arrenatherum elatius* (L.) J. u. C. Presl and *Dactylis glomerata* L. proved to be extremely sensitive. In general the species of the *Gramineae* and the *Polygonaceae* seem to be sensitive, whereas those of the *Labiatae, Compositae, Papilionaceae, Cruciferae* and *Umbelliferae* seem to be very resistant.

The intensity of the symptoms is influenced, among other things, by a number of environmental factors (topographical features, predominant direction of winds, precipitation and degree of afforestation).

Literaturverzeichnis

Benedict, H. M., and W. H. Breen, 1955: The use of weeds as a means of evaluating vegetation damage caused by air pollution. Proc. Third Nat. Air Pollution Symposium, Pasadena, Kaliforn., 177—190.

Bredemann, G., 1956: Biochemie und Physiologie des Fluors und der industriellen Fluor-Rauchschäden. Akademie-Verlag Berlin, 2. Aufl.

— —, und Radeloff, 1932: Zur Diagnose von Fluorrauchschäden. Phytopath. Z. **5**, 195—206

Bursche, E.-M., 1955: Vegetationsschäden durch Fluor. Beiträge z. Außenlufthygiene, Schriftenreihe d. Ver. f. Wasser-, Boden- u. Lufthygiene Berlin-Dahlem, Nr. 10, 39—83. Stuttgart.

Miller, V., F. Johnson and D. Allmendinger, 1948: Fluorine analysis of Italian prune foliage affected by marginal scorch. Phytopathology **38**, 30—37.

de Ong, E., 1946: Injury to apricot leaves from fluorine deposit. Phytopathology **36**, 649—471.

Kurze Mitteilung

Aus der Bayerischen Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz, München

Zur Morphologie der Enationen auf Blättern viruserkrankter Kirschbäume

Von

N. Mallach

Mit 4 Abbildungen

Enationen auf der Blattunterseite sind ein charakteristisches Symptom bei zahlreichen Viruskrankheiten. An Obstbäumen treten Enationen bekanntlich bei der Pfeffingerkrankheit der Süßkirsche und bei der Stecklenbergerkrankheit der Sauerkirsche auf. Im Pflanzenreich sind aber auch ähnliche teratologische Bildungen bekannt, die nicht durch eine Virusinfektion verursacht werden, sich vielmehr auf genetische oder andere noch unbekannte Ursachen zurückführen lassen.

Daher ist, wie Stoll (1952) in seiner Arbeit über die Symptome der Pfeffingerkrankheit der Kirschbäume ausführt, die möglichst genaue Erfassung auch der kleinsten morphologischen und anatomischen Veränderungen erkrankter Bäume insbesondere für die Erkennung von Grenzfällen und zur Ausscheidung möglicherweise vorhandener symptomloser Krankheitsträger erforderlich.

Die morphologischen, anatomischen und histogenetischen Verhältnisse dieser durch verschiedene Ursachen bedingten teratologischen Bildungen wurden von verschiedenen Autoren untersucht (u. a. Praceus 1958).

Stoll beschreibt in seiner Arbeit im Zusammenhang mit den für die Pfeffingerkrankheit charakteristischen Enationen als weitere organische Wucherungen sogenannte Drüsenköpfchen. Bei diesen Drüsenköpfchen handelt es sich ebenfalls um pathologische Auswüchse. Da er zwischen den Drüsenköpfchen und den „gummiartigen Zähnen am Blattrand" Übergangsformen fand, spricht er die Vermutung aus, daß es sich um homologe Bildungen handelt.

Die folgenden Befunde bestätigen nicht nur die Vermutung Stolls, sondern zeigen auch, daß es sich bei den Enationen und den Drüsenköpfchen vermutlich nicht um zwei verschiedenartige, sondern um dieselben organoiden

Abb. 1. Blattartige Enationen der Süßkirsche. Randspitzen mit Drüsenköpfchen

Abb. 2. Drüsenköpfchen. Links und auf der Blattader frei, rechts oben zur Enation verbreitert

Abb. 3. Freie Drüsenköpfchen

Abb. 4. Blattrand mit „gummiartigen Zähnen"

Wucherungen handelt. Enationen und Drüsenköpfchen dürften lediglich zwei verschiedene Entwicklungsstufen derselben Bildungen darstellen. Abbildung 1 zeigt blattartige Enationen, auf deren Randspitzen je ein Drüsenköpfchen sitzt. Zugleich ist zu erkennen, daß diese Drüsenköpfchen die Endpunkte von Nebenadern sind. Abbildung 2 läßt im Auflicht die Enationen gewissermaßen in statu nascendi erkennen; links neben und auf dem Blattnerv stehen völlig freie Drüsenköpfchen, die rechte Reihe dagegen zeigt von unten nach oben ihre stufenweise Verbreiterung zur Enanation. Die Abbildungen 3 und 4 lassen im Durchlicht auf einem jungen, noch nicht voll entfalteten Kirschblatt die anatomische Übereinstimmung in einer Enationsreihe stehender noch freier Drüsenköpfchen mit den „gummiartigen Zähnen" des Blattrandes hervortreten. Laubblatt und Enation, sowie Blattranddrüse und Drüsenköpfchen sind also homologe Bildungen.

Die hier dargestellten Verhältnisse sind zugleich ein Beispiel für die wohl allgemeingültige Regel, daß sich nach Feststellung der Homologie eines Organs (Laubblatt—Enation) auch die übrigen Organe als homolog erweisen (Blattranddrüse—Drüsenköpfchen).

Literaturverzeichnis

STOLL, K., 1952: Über die Symptome der Pfeffingerkrankheit der Kirschbäume. Phytopath. Z. **18**, 293—306.

PRACEUS, CH., 1958: Anatomische Untersuchungen an Enationen von Aspermie-Virus infizierten Pflanzen. Phytopath. Z. **33**, 248—262.

Besprechungen

Stahl, Marianne, und H. Umgelter, Pflanzenschutz im Blumen- und Zierpflanzenbau. Band V der Sammlung „Handbuch des Erwerbsgärtners". 371 Seiten mit 233 Abbildungen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1959. Halbleinen MD 25,—.

Der Zierpflanzenbau nimmt in der Pflanzenschutzberatung noch immer eine Sonderstellung ein. Die Maßnahmen, die der Pflanzenarzt in der Landwirtschaft, im Gemüse-, Obst- und Weinbau zur Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen empfiehlt, sind im allgemeinen in exakten, breit angelegten Versuchen erarbeitet und erprobt worden. Dem Zierpflanzenschutz dagegen, der in Deutschland bis heute Stiefkind der Forschung geblieben ist, fehlt diese experimentelle Grundlage weitgehend. Der ausländischen Literatur können zwar mancherlei Hinweise entnommen werden, doch sind die unter anderen Klimabedingungen gewonnenen Ergebnisse meistens nicht ohne weiteres übertragbar. Die Pflanzenschutzberatung im deutschen Zierpflanzenbau beruht daher, was die Bekämpfung anlangt, in der Hauptsache auf praktischen Erfahrungen und Beobachtungen einzelner Fachleute. Dazu gehören die Verfasser, und schon allein deshalb nimmt der am Zierpflanzenschutz interessierte Phytopathologe dieses seit längerem angekündigte Buch mit großen Erwartungen zur Hand. Daß es in erster Linie für den praktischen Gärtner bestimmt ist, worauf im Vorwort ausdrücklich hingewiesen wird, ändert daran nichts.

Die Gliederung des vielfältigen Stoffes entspricht bewährten Vorbildern. Es wäre ja auch abwegig, die wahrscheinlich bestmögliche Lösung nur deshalb nicht zu wählen, weil sie nicht mehr neu ist.

Der allgemeine Teil des Buches wird mit einem Kapitel über die wirtschaftliche Bedeutung des Pflanzenschutzes im Zierpflanzenbau eingeleitet. Dann werden in großen Zügen die Krankheitsursachen behandelt, und schließlich folgt der umfangreichste Abschnitt dieses ersten Teiles: die eingehende Darstellung der heutigen Möglichkeiten bei der Abwehr und Bekämpfung von Zierpflanzenkrankheiten und -schädlingen. Hier findet man detaillierte Angaben über die wichtigsten Bekämpfungsverfahren und über die Wirkstoffe, die der Gärtner kennen sollte. Sehr wertvoll ist die Zusammenstellung der bisherigen Erfahrungen über die Verträglichkeit der chemischen Bekämpfungsmittel bei Zierpflanzen. Die unerläßlichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit giftigen Pflanzenschutzmitteln werden ausführlich beschrieben. Auch die künftige Bedeutung einer biologischen Schädlingsbekämpfung im Zierpflanzenbau wird erörtert, wobei die Verfasser um einen optimistischen Tenor bemüht sind.

Im speziellen Teil des Buches werden zuerst Erreger und Schädlinge mit allgemeiner Bedeutung behandelt. Im zweiten Abschnitt folgen die Krankheiten und Schädigungen der einzelnen, alphabetisch angeordneten Zierpflanzengattungen. Hier ist auf Vollständigkeit verzichtet worden; es werden nur die wichtigsten Zierpflanzen und die wichtigsten Krankheiten und Schädlinge berücksichtigt. Der Auswahl wird man ohne größere Vorbehalte zustimmen können. Bei *Aphelandra* hätten allerdings wohl die Schildläuse erwähnt werden müssen, die bei dieser Kultur häufig eine sehr wichtige Rolle spielen, und bei *Erica gracilis* sollte der Rost eigentlich nicht fehlen. Für viele Pflanzen werden kurze Kulturhinweise gegeben, die für den Phytopathologen, der im Zierpflanzenbau nicht zu Hause ist, nützlich sein können. Die Symptome und der Verlauf der Krankheiten werden anschaulich geschildert. Auf die Biologie der Erreger und Schädlinge wird eingegangen, soweit das zum Verständnis der empfohlenen Gegenmaßnahmen notwendig ist. Was über die Bekämpfung gesagt wird, entspricht dem neuesten Stande unserer Möglichkeiten. — Auf Seite 285 sind Wurzelmilben an Lilien versehentlich als Quarantäneschädlinge bezeichnet worden.

Die Darstellung ist knapp und klar und vorzüglich auf die Mentalität des Gärtners abgestimmt. Man merkt dem Buch an, daß es aus jahrelanger Beratungspraxis, also weitgehend aus eigener Anschauung und Erfahrung entstanden ist. Unverkennbar ist auch die Gewissenhaftigkeit, mit der die Verfasser zu Werke gegangen sind. Nicht alle Lehrbücher sind schon in der ersten Auflage so ausgereift und ausgefeilt wie dieses.

Das Buch ist reich mit Bildern ausgestattet, von denen die meisten recht gut sind. Hervorzuheben sind die ausgezeichneten, von H. Steiner beigesteuerten Nahaufnahmen tierischer Schädlinge. Leider muß der Bildnachweis, der sich am Ende des Buches befindet, wegen seiner Unübersichtlichkeit bemängelt werden.

Das Literaturverzeichnis enthält außer den bekannten phytopathologischen Lehr- und Handbüchern nur einzelne Originalarbeiten. Das ist zu bedauern, zumal ein gründlicherer Quellennachweis besonders deutlich gezeigt hätte, daß das vorliegende Buch weit mehr ist als eine nur kompilatorische Leistung.

Für den Phytopathologen, der sich mit Fragen des Zierpflanzenschutzes zu beschäftigen hat, wird der „Stahl-Umgelter" künftig eines der wichtigsten Nachschlagewerke sein. Im übrigen haben wir hier wohl das beste Lehrbuch über Pflanzenkrankheiten vor uns, das dem praktischen Zierpflanzengärtner gegenwärtig empfohlen werden kann.

Sauthoff, Berlin-Dahlem

Wir empfehlen zum Bezug:

Anzeiger für Schädlingskunde

vereinigt mit „Schädlingsbekämpfung"

Zugleich Nachrichtenblatt der Deutschen Gesellschaft für angewandte Entomologie e. V.

Herausgebergemeinschaft:

Reg.-Rat Dr. W. FREY, Berlin, Prof. Dr. H. KEMPER, Berlin, Ob.-Reg.-Rat Dr. E. LEIB, Bonn,
Prof. Dr. Dipl.-Ing. E. SCHIMITSCHEK, Hann. Münden,
und Prof. Dr. W. ZWÖLFER, München

Schriftleitung:

Prof. Dr. Dipl.-Ing. E. SCHIMITSCHEK

Im Jahre 1925 wurde der „Anzeiger für Schädlingskunde" von dem Nestor der angewandt-entomologischen Wissenschaft in Deutschland, Prof. Dr. Dr. h. c. K. ESCHERICH, sowie Prof. Dr. F. STELLWAAG gegründet. Die Zeitschrift hat es sich zur Aufgabe gemacht, alle Probleme einer wirksamen Bekämpfung der Schädlinge sowie die Kenntnisse über die Arten und Lebensweise und die Methoden ihrer Bekämpfung interessant und anregend in Originalarbeiten und Berichten deutscher und ausländischer Forscher darzustellen.

Seit 1954 erscheint der „Anzeiger für Schädlingskunde" vereinigt mit der Zeitschrift „Schädlingsbekämpfung" und bietet somit allen beteiligten Berufskreisen eine umfassende Orientierung über das Gesamtgebiet der Bekämpfung tierischer Schädlinge in landwirtschaftlichen, gärtnerischen und forstlichen Kulturen sowie über die Gebiete des Gesundheits- und Vorratsschutzes. Neben den Originalarbeiten ergänzen kleine Mitteilungen, Tagungsberichte, Buchbesprechungen, Personalien, Kurzberichte und eine umfassende Patentschau den reichhaltigen Inhalt. Besonders hervorzuheben ist die ausführliche Zeitschriftenschau, in der laufend über alle wichtigen Veröffentlichungen des In- und Auslandes getrennt nach Sachgebieten referiert wird. Auf instruktive und sorgfältige Illustrierung aller Beiträge wird besonderer Wert gelegt.

Erscheinungsweise und Bezugsbedingungen:

Der „Anzeiger für Schädlingskunde" erscheint monatlich. Jedes Heft hat einen Umfang von 16 Seiten im Format DIN A 4. Der Bezugspreis beträgt vierteljährlich DM 12,—, zuzüglich Versandkosten. Das Einzelheft kostet DM 5,—.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Als neue Zeitschrift erscheint ab Mai

Zeitschrift für Kulturtechnik

Ergebnisse der Forschung und ihre Anwendung bei Planung und Durchführung der Standortsverbesserung, Flurgestaltung, Wasserregelung und Abwasserverwertung

Unter Mitwirkung zahlreicher Wissenschaftler des In- und Auslandes
herausgegeben von
Prof. Dr. C. Husemann, Berlin-Dahlem, Prof. Dr. B. Ramsauer, Wien, und
Prof. Dr. M. Schirmer, Bonn

Standortsverbesserung, Flurgestaltung, Entwässerung, Bewässerung, Abwasserverwertung sind aktuelle Probleme, die mit neuzeitlichen kulturtechnischen Maßnahmen gelöst werden. Sie sind größtenteils nicht nur in Küsten- und Sumpfgebieten von Bedeutung, sondern bilden zunehmend den Kern aller Überlegungen für eine Verbesserung der Agrarstruktur und sind damit auch wichtige Faktoren betriebswirtschaftlicher Planung und steigender Erträge in der Landwirtschaft.

Ein auf internationale Zusammenarbeit gegründetes Fachorgan, das eine maßgebliche Übersicht über alle speziellen Probleme der kulturtechnischen Forschung und ihrer Nutzanwendung gewährleistet, erscheint nun mit der neuen Zeitschrift ab Mai dieses Jahres. Das Gremium bekannter Wissenschaftler des In- und Auslandes, das die Herausgeber in ihrer Arbeit unterstützt, sichert ihr einen großen Wirkungsbereich und eine entsprechende Verbreitung.

Die Zeitschrift sieht ihre Hauptaufgabe in der Behandlung folgender aktueller Themen: Standortsuntersuchung, Wasserhaushaltsforschung, Weiterentwicklung der kulturtechnischen und pflanzensoziologischen Untersuchungsmethoden und deren Nutzanwendung bei der Planung und Durchführung von Meliorationen und Flurgestaltung, Ödlandkultivierung und Landgewinnung, Abwasserlandbehandlung, Abwasser- und Abwasserschlammverwertung sowie aller Probleme auf dem Gebiet der Entwässerung und Bewässerung. Neben Originalarbeiten werden auch Besprechungen (Referate) der einschlägigen in- und ausländischen Literatur veröffentlicht.

Die Kulturtechnik stellt ein wesentliches gemeinsames Forschungsgebiet für die gesamte Wasserwirtschaft und Landwirtschaft dar. Entsprechend der Vielgestaltigkeit ihres Inhalts wendet sich die neue „Zeitschrift für Kulturtechnik" nicht nur an die engeren Kreise der kulturtechnisch Tätigen, sondern darüber hinaus an alle, die in irgendeiner Form mit der Kulturtechnik in Verbindung stehen.

Erscheinungsweise und Bezugspreis:

Die „Zeitschrift für Kulturtechnik" erscheint ab Mai 1960 jeden zweiten Monat. Umfang je Heft 64 Textseiten auf Kunstdruckpapier und 4 Umschlagseiten im Format Gr. 8° (16,7 × 25 cm). Bezugspreis: Halbjährl. DM 28,— zuzügl. Versandkosten. Einzelheft DM 10,—.

VERLAG PAUL PAREY · BERLIN UND HAMBURG